

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 11 月 22 日 (22.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/88100 A1

(51) 国際特許分類: C12N 5/06, C07K 16/18, C12P  
21/08, C12Q 1/02, G01N 33/50, 33/15, A61K 35/48,  
35/30, 35/36, A61P 25/28, 25/00, 17/00

(74) 代理人: 弁理士 小栗昌平, 外(OGURI, Shohei et al.)  
; 〒107-6028 東京都港区赤坂一丁目12番32号 アーク  
森ビル28階 栄光特許事務所 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/04080

(22) 国際出願日: 2001 年 5 月 16 日 (16.05.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-144059 2000 年 5 月 16 日 (16.05.2000) JP  
特願2000-290819 2000 年 9 月 25 日 (25.09.2000) JP

(71) 出願人: 協和酸酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO  
KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田  
区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO,  
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,  
TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 笹井芳樹 (SASAI, Yoshiki) [JP/JP]; 〒606-8507  
京都府京都市左京区聖護院川原町53番地 京都大学  
再生医科学研究所内 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 西川伸一 (NISHIKAWA, Shin-Ichi); 〒606-  
8315 京都府京都市左京区吉田近衛町 京都大学医学  
部分子遺伝学教室内 Kyoto (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書  
— 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された  
生物材料の寄託に関する表示。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL METHOD OF INDUCING THE DIFFERENTIATION OF EMBRYONIC STEM CELLS INTO ECTODERMAL CELLS AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 胚性幹細胞の外胚葉系細胞への新規な分化誘導法及びその用途

(57) Abstract: A method of inducing the differentiation of embryonic stem cells into ectodermal cells which involves the step of culturing the embryonic stem cells in a non-agglutinated state, and a method of inducing the differentiation of embryonic stem cells into cells originating in ectodermal cells which involves the step of culturing the embryonic stem cells in a non-agglutinated state; a medium and a medium supernatant to be used in these methods; a differentiation inducer to be used in these methods; stroma cells having an activity of inducing the differentiation in these methods or a factor originating therein; an antibody specifically recognizing these stroma cells; an antigen recognizing this antibody; cells induced by the above methods; a method of evaluating a substance relating to the regulation of the differentiation process from embryonic stem cells into ectodermal cells or cells originating in ectodermal cells by performing the above methods, and a screening method; and drugs containing the above-described stroma cells or the factor originating therein, the above-described antibody, the above-described antigen or the above-described cells.

[続葉有]

BEST AVAILABLE COPY

WO 01/88100 A1



---

(57) 要約:

本発明により、胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程を含む、胚性幹細胞を外胚葉細胞に分化誘導する方法および胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程を含む、胚性幹細胞を外胚葉由来の細胞に分化誘導する方法；該方法で用いる培地および培地上清；該方法で用いられる分化誘導剤；該方法の分化誘導する活性を有するストローマ細胞またはその由来の因子；該ストローマ細胞を特異的に認識する抗体；該抗体を認識する抗原；該方法によって誘導される細胞；該方法を行うことによる胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程における調節に関連する物質の評価方法およびスクリーニング方法；および該ストローマ細胞またはその由来の因子、該抗体、該抗原または該細胞を含む医薬が提供される。

## 明 細 書

## 胚性幹細胞の外胚葉系細胞への新規な分化誘導法及びその用途

## 技術分野

本発明は、胚性幹細胞から機能性細胞を分化誘導する方法に関する。さらに詳細には、本発明は、細胞医療として有用な外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を胚性幹細胞から分化誘導する方法、該分化誘導した細胞、並びにそれら用途に関する。本発明はまた、上記方法で用いる培地、上記方法で用いるストローマ細胞を特異的に認識する抗体、該抗体が認識する抗原、並びにそれら用途にも関する。

## 背景技術

通常、胚性幹細胞 (embryonic stem cell) とは、インビトロにおいて培養することが可能で、かつ、他の個体の着床以前の胚、例えば、胚盤胞腔中に注入すると生殖細胞をも含むすべての細胞に分化できる細胞のことを意味しており、胚性幹細胞あるいはES細胞とも呼ばれている。

初期胚の発生と胚性幹細胞の関係をマウスを例として以下に説明する。

マウス受精卵は、卵管から子宮に向かって移動しながら 2 細胞、4 細胞、8 細胞と分裂を行い 16 細胞期になった時点で細胞間の接着が強まるコンパクション (compaction) が起こり、細胞間の境界が不明瞭になった桑実胚 (morula) と呼ばれる段階に至る。さらに、受精後 3.5 日には、胚内部に割腔 (blastocoel) と呼ばれる空間ができ胚盤胞 (blastocyst) になる。このとき胚盤胞は外側の栄養外胚葉 (trophectoderm) 層と内部細胞塊 (inner cell mass : ICM) から構成されている。胚盤胞は受精後 4.5~5.5 日にかけて子宮壁に着床する。着床の時期には、内部細胞塊の中で割腔に面した表面の細胞が原

始内胚葉 (primitive endoderm) 細胞に分化している。これらのうち、一部の細胞は胚本体から離れ栄養外胚葉層の中側へ遊走し遠位内胚葉 (parietal endoderm) 細胞となり、細胞外マトリックスを分泌してライヘルト膜 (Reichert's membrane) をつくる。

一方、胚体部分近くの原始内胚葉細胞は近位内胚葉 (visceral endoderm) と呼ばれる細胞層をつくる。これら遠位および近位内胚葉は、やがて胎児本体を保護して栄養物や老廃物を母体との間で交換するための支持組織となる。将来胎児本体をつくる内部細胞塊の細胞は増殖して原始外胚葉 (primitive ectoderm) と呼ばれる細胞層をつくる。原始外胚葉は、胚性外胚葉 (embryonic ectoderm) あるいは上葉細胞層 (epiblast) とも呼ばれている。着床後の胚は全体として円筒形に成長するため、受精後 5.5~7.5 日の胚は卵筒胚 (egg cylinder) と呼ばれる。卵筒胚の子宮との付け根側半分には、将来胎盤をつくる胚体外組織 (extraembryonic tissue) が栄養外胚葉から分化し形成されている。受精後 6.5 日には原始外胚葉層に原条 (primitive streak) と呼ばれる溝が現れ、この部分で原始外胚葉が間充細胞様に変化して原始外胚葉層と近位内胚葉層との間に入り込み、原条から左右および前後方向に移動して胚性中胚葉細胞層 (embryonic mesoderm) を形成する。この細胞層の中には、将来胎児本体の内胚葉 (definitive endoderm) になる細胞も含まれている。

このように、原始外胚葉からは外胚葉のみならず、胎児の中胚葉および内胚葉の 3 胚葉が作られることが明らかにされており、胎児のすべての組織は原始外胚葉由来であることが示されている。なお、神経系や表皮系の細胞は外胚葉から作られることが明らかにされており、神経系の細胞へ分化が運命づけられた外胚葉を神経性外胚葉 (neural ectoderm)、表皮系の細胞へ分化が運命づけられた外胚葉は非神経性外胚葉 (non-neural ectoderm) と呼ばれている。



以上述べた胚発生過程における細胞系譜の中で、受精卵からはじまり桑実胚までの個々の割球細胞、胚盤胞における内部細胞塊の細胞、および原始外胚葉層を構成している細胞は全能性を持ち未分化な胚性幹細胞としての性質を有している。原始外胚葉が各胚葉に分化をはじめるとそのほとんどの細胞は全能性を失うが、その一部が次の世代へ遺伝子を伝達する役目を担う始原生殖細胞 (primordial germ cell) として残される。始原生殖細胞は、原始外胚葉が各胚葉に分化するときに原条から陥入する胚性中胚葉細胞層の中にまぎれて後方に移動し、尿膜 (allantois) 基部の胚体外中胚葉 (extraembryonic mesoderm) の中の特定の部位に出現する。始原生殖細胞は、やがて、生殖巣原基へ向かって移動し生殖巣の性分化にしたがって卵子や精子を形成する。

胚性幹細胞は、胚盤胞の内部に存在する未分化幹細胞である内部細胞塊を構成している細胞を培養に移し、頻繁に細胞塊の解離と継代を繰り返すことで樹立できる。この細胞は正常核型を維持しながらほぼ無限に増殖と継代を繰り返すことが可能であり、内部細胞塊と同じようにあらゆる種類の細胞に分化することができる多分化能を保つことが知られている。

胚性幹細胞を他個体の胚盤胞の中に注入すると、宿主胚の内部細胞塊の細胞と混ざり合っ胚と胎児の形成に寄与しキメラ個体をつくる。極端な場合には、胎児本体がほぼ注入した胚性幹細胞だけからなる個体が生まれることもある。キメラ個体の中で、注入した胚性幹細胞が将来卵や精子をつくる始原生殖細胞の形成に寄与した個体を生殖系列キメラと呼び、この生殖系列キメラを交配させることによって注入した胚性幹細胞由来の個体を得ることができることから、胚性幹細胞はあらゆる細胞に分化することができる全能性を有していることが証明されている (Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) (以下、「マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル」と略す); Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford

University Press (1993) (以下、「ジーン・ターゲッティング」と略す); バイオマニュアルシリーズ 8 ジーンターゲッティング, ES細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社 (1995) (以下、「ES細胞を用いた変異マウスの作製」と略す))。

胚盤胞の内部細胞塊を通常の初代培養のように培養すると、ほとんどの場合、直に繊維芽細胞様の細胞に分化してしまう。未分化な状態を維持しながら培養するためには、通常、胎児から調製した初代繊維芽細胞やSIHMマウス由来のSTO細胞などをフィーダー細胞として用いる必要がある (ジーン・ターゲッティング; ES細胞を用いた変異マウスの作製)。フィーダー細胞の上で適切な細胞密度を保ち、頻繁に培養液を交換しながら細胞の解離と継代を繰り返すことで未分化幹細胞の性質を保持したまま維持することが可能となる (マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル)。

胚性幹細胞の未分化状態を維持する因子としてLIF (leukaemia inhibitory factor) が同定されており (A. G. Smith and M. L. Hooper; *Dev. Biol.*, 121, 1 (1987); A. G. Smithら、*Nature*, 336, 688 (1988); P. D. Rathjenら、*Genes Dev.*, 4, 2308 (1990))、培養液中にLIFを添加することによって、フィーダー細胞を用いなくても全能性をもつ胚性幹細胞を単離し培養することが可能なことが報告されている (J. Nicholsら、*Development*, 110, 1341 (1990); S. Peaseら、*Dev. Biol.*, 141, 344 (1990))。また、LIFそのものを培養液に添加する代わりに、LIFの受容体のサブユニットの一つであるgp130を受容体として共有しているインターロイキン 6 のファミリー分子の添加も有効であることが示されている (D. P. Gearing and G. Bruce、*New Biol.*, 4, 61 (1992); J. I. Conoverら、*Development*, 119, 559 (1993); C. Piquet-Pellorceら、*Exp. Cell Res.*, 213, 340 (1994); D. Pennicaら、*J. Biol. Chem.*, 270, 10915 (1995))。

さらに、gp130 を直接活性化する作用を有するインターロイキン 6 と可溶性インターロイキン 6 受容体とを併用することで、胚性幹細胞の未分化状態を維持し生殖系列の細胞の形成に寄与する胚性幹細胞を樹立した報告がなされており (K. Yoshidaら、Mech. Dev., 45, 163 (1994); J. Nicholsら、Exp. Cell Res., 215, 237 (1994); 特開平 7-51060 号)、gp130 からの細胞内情報伝達が胚性幹細胞の多分化能や未分化性の維持に重要な働きをしていることが明らかにされている。このことは、LIF遺伝子やLIF受容体遺伝子を遺伝子ターゲティングの手法を用いて破壊した欠損マウスにおいても初期胚の正常な発生が観察されるが (C.L. Stewartら、Nature, 359, 76 (1992); J.L. Escaryら、Nature, 363, 361 (1993); M. Liら、Nature, 378, 724 (1995); C.B. Wareら、Development, 121, 1283 (1995))、gp130 遺伝子を破壊したマウスにおいては、胎生 12.5 日から出産に至る過程で胎生死することからも支持されている (K. Yoshidaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 407 (1996))。

マウスにおいて胚性幹細胞が初めて樹立されて以来 (M. J. Evansら、Nature, 292, 154 (1981); G.R. Martin; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7634 (1981))、効率的な胚性幹細胞の樹立方法、例えば非マウスにおける胚性幹細胞の樹立法 (米国特許 5,453,357 号; 米国特許 5,670,372 号) などが研究され、これまでに、ラット (P.M. Iannacconeら、Dev. Biol., 163, 288 (1994))、ニワトリ (B. Painら、Development, 122, 2339 (1996); 米国特許 5,340,740 号; 米国特許 5,656,479 号))、ブタ (M.B. Wheeler; Reprod. Fertil. Dev., 6, 563 (1994); H. Shimら、Biol. Reprod., 57, 1089 (1997))、サル (J.A. Thomsonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 7844 (1996))、ヒト (J.A. Thomsonら、Science, 282, 1145 (1998); M.J. Shamblottら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 13726 (1998)) の胚性幹細胞が樹立されている。

胚性幹細胞を、胚性幹細胞と同系統の動物の皮下などに移植すると、様々な組織が混ざり合った奇形腫が形成されることが知られている（マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル）。

また、インビトロの培養においても、胚性幹細胞を凝集させ、いったん擬似胚状態にしたエンブリオイドボディと呼ばれる細胞塊（embryoid body; 以下、「EB」とも略す）を形成させることによって分化を誘導し、内胚葉細胞、外胚葉細胞、中胚葉細胞、血液細胞、内皮細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、グリア細胞、神経細胞、上皮細胞、メラノサイト、ケラチノサイトの各種細胞を出現させることが可能であることが報告されている（P.D. Rathjenら、Reprod. Fertil. Dev., 10, 31 (1998)）。しかしながら、この培養方法による分化の誘導では、細胞凝集塊の形成による自発的な分化が引き起こされ、結果として目的とした細胞の出現が観察されているのであって、ある特定の細胞集団を効率的に誘導するまでには至っておらず、同時に多種類の組織細胞の出現も観察されている。

胚性幹細胞から神経系細胞を効率的に分化誘導させる方法に関しては、様々な試みがなされている。

EBを形成させた後、ポリ-L-リジンあるいはラミニンをコートした硝子デッシュ上でNGF（神経成長因子）を添加した培地を用いて培養を続けると、神経系細胞の分化に重要な転写因子Pax3 およびニューロフィラメントの発現が有為に上昇することが報告されている（G. Yamadaら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 199, 552 (1994)）。後述するEC細胞において、レチノイン酸処理により神経系への分化が促進されるという知見（E.M.V. Jones-Villeneuveら、J. Cell Biol., 94, 253 (1982); G. Bainら、BioEssays, 16, 323 (1994)）からその効果が胚性幹細胞においても試され、レチノイン酸存在下で4日間EBを培養した後、トリプシン処理し単層培養を行なうと、突起を進展させ活動電位を発生する神経細胞様の細胞が約40%という高率で出現し、この細胞では蛋白レ

ベルでクラスIIIチューブリン、ニューロフィラメントMサブユニット、神経特異的なカルモジュリン結合キナーゼCの基質であるGAP-43 (growth-associated protein-43)、MAP-2 (microtubule-associated protein-2)、 $\gamma$ アミノ酪酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid; 以下、「GABA」とも略す) 受容体、NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体、シナプシンの発現が、mRNAレベルでニューロフィラメントLサブユニット、グルタミン酸受容体、チロシン水酸化酵素、転写因子 Brn-3、GFAP (glial fibrillary acidic protein)、GABA合成酵素であるGAD (glutamic acid decarboxylase) の発現が観察されることが報告されている (G. Bainら、Dev. Biol., 168, 342 (1995); F.A. Michaelら、J. Neurosci., 16, 1056 (1996))。

Brn-3 は中枢神経で (X. Heら、Nature, 340, 35 (1989))、GAP-43 は神経軸索で (L.I. Benowitz and A. Routtenberg; Trends Neurosci., 20, 84 (1997))、MAP-2 は神経樹状突起で (L.I. Binderら、Ann. NY Acad. Sci., 76, 145 (1986))、GFAPはグリア細胞で (A. Bignamiら、Brain Res., 43, 429 (1972))、GABA受容体およびGADは抑制性神経で (Y. Chang and D.I. Gottlieb; J. Neurosci., 8, 2123 (1988))、グルタミン酸受容体およびNMDA受容体は興奮性神経で発現することが知られているため、レチノイン酸を用いて分化を誘導した場合には、様々な神経系細胞への分化のシグナルが同時に伝わることを示されている。

また、EB形成による細胞間相互作用を介さないで、胚性幹細胞に直接レチノイン酸を作用させただけでは、神経系細胞への分化誘導は観察されないことが報告されている (H.G. Slagerら、Dev. Gen., 14, 212 (1993))。単層培養した胚性幹細胞に  $10^{-7}$  mol/l濃度のレチノイン酸を作用させると、3日後約50%の細胞でGAP-43の発現が、4~5日後5%未満の細胞でニューロフィラメント-165 (S.H. Yen and K.L. Fields; J. Cell Biol., 88, 115 (1981)) の発現が蛋白レベルで観察されているが、GAP-43陽性細胞のほとんどは内胚葉系細胞様の形

態であることが報告されている (W.G. van Inzenら、*Biochim. Biophys. Acta.*, 1312, 21 (1996))。GAP-43 陽性細胞の中には一部グリア細胞様の形態を示し、そのうち約半分がニューロフィラメント-165 陽性の細胞であるが、EBを形成後のレチノイン酸処理で誘導される神経細胞様の細胞と比較してGAP-43 およびニューロフィラメント-165 とともに抗体染色による染色強度が低いことが報告されている (W.G. van Inzenら、*Biochim. Biophys. Acta.*, 1312, 21 (1996))。このように、EB形成による細胞間相互作用は効率的な神経系細胞の分化誘導に必要であることが確かめられている。

さらに、グリア細胞様の形態をとる細胞を対象としてパッチクランプの手法を用い活動電位を測定したところ、5-HT (5-hydroxytryptamin)、GABA、カイン酸、グルタミン酸、ドーパミン、カルバコール刺激による電位の発生が調べた約半数の細胞で観察されるが、対照として用いたEB形成後のレチノイン酸処理で誘導される神経細胞様の細胞では、カルバコール刺激による活動電位の発生が観察されず、代わりにノルアドレナリン刺激による活動電位の発生が観察されており、神経細胞の分化の方向性の決定にもEB形成による細胞間相互作用が重要であることが示されている (W.G. van Inzenら、*Biochim. Biophys. Acta.*, 1312, 21 (1996))。細胞凝集によるEB形成では、EB表面の細胞層が原始内胚葉様に分化することが知られており、この細胞層と内部の未分化細胞との何らかの相互作用により分化が誘導されていることが想定されているが、その因子の具体的な同定には至っていない (P.D. Rathjenら、*Reprod. Fertil. Dev.*, 10, 31 (1998))。

その後、さらに、胚性幹細胞に対するレチノイン酸の効果が詳細に解析された結果、レチノイン酸が添加された培地で形成されたEBを組織培養用のデッシュで培養すると、まず、ネスチン陽性で神経細胞およびグリア細胞の共通の前駆細胞である細胞が出現し、次に、GABA作動性神経細胞、コリン作動性神経細胞、GFAP陽性のアストロサイト、04 陽性 (M. Schachnerら、*Dev. Biol.*, 83,

328 (1981)) のオリゴデンドロサイト様に分化した細胞が出現することが明らかにされている (A. Fraichardら、J. Cell Sci., 108, 3181 (1995))。

生体において、神経細胞とグリア細胞がネスチン陽性の共通の前駆細胞から分化することはレトロウイルスを用いたラベリング実験で示唆され (U. Lendahlら、Cell, 60, 585 (1990); J. Priceら、Development Supplement, 2, 23 (1991); J. Priceら、Brain Pathol., 2, 23 (1992))、その後、成体の脳に存在する前駆細胞が神経系幹細胞として単離されたことで証明されている (S.J. Morrisonら、Cell, 88, 287 (1997); R.D.G. McKay, Science, 276, 66 (1997))。

しかしながら、レチノイン酸を胚性幹細胞の分化誘導に用いる際には、生理的に存在している濃度より非常に高い濃度 (10 倍～100 倍) で用いられる。生理的に存在している濃度より高いレチノイン酸を用いることは、毒性の面から懸念されているため、得られた細胞を移植に用いるのは難しい。そこでレチノイン酸を用いずに、より生理的条件に近い状態で胚性幹細胞を神経系の細胞に分化誘導する試みもなされている。

4 日間浮遊培養することによって形成させたEBを組織培養用のデッシュ上で 1 日培養し接着させ、インスリン、トランスフェリン、塩化セレン、フィブロネクチンを含むITSFn培地 (A. Rizzino and C. Growley, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 457 (1980)) を用いて 5～7 日間培養することで、ネスチン陽性でかつ脳で発現が観察される脂肪酸結合蛋白陽性 (A. Kurtzら、Development, 120, 2637 (1994)) の神経上皮細胞様の前駆細胞 (neuroepithelial precursor cells) が誘導され、その前駆細胞をbFGF (basic fibroblast growth factor) とラミニンを含むmN3 無血清培地で培養すると前駆細胞として増殖維持されるが、bFGFを除いた培地では中枢系の神経細胞およびグリア細胞に分化し、さらに血清を添加した培地を用いて培養を続け

ると興奮性神経系および抑制性神経系のシナプス形成が観察されることが報告されている (S. Okabeら、Mech. Dev., 59, 89 (1996))。

このようにしてインビトロで誘導された神経系細胞が、生体内において正常に機能しうるかについても検討されている。

上述のITSFn培地を用いて誘導したマウスの神経上皮細胞様の前駆細胞を胎生 16 日～18 日のラットの脳室に移植すると、移植した前駆細胞が移動し脳組織に取り込まれ、神経、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化し、形態的には宿主の細胞と区別がつかないことが観察されている (O. Brustleら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 14809 (1997))。しかしながら、移植部位には、盛んに分裂を繰り返す神経管様の構造体やアルカリフォスファターゼ陽性の未分化細胞からなる小さなクラスターの形成など、本来の組織には観察されない奇形腫瘍組織の形成が観察されている。

このような奇形腫瘍組織の形成は、胚性幹細胞からレチノイン酸を用いて誘導した神経系の前駆細胞の移植においても観察されている (J. Dinsmoreら、Cell Transplant., 5, 131 (1996); T. Deaconら、Exp. Neurol., 149, 28 (1998))。

その後、胚性幹細胞からグリア細胞の前駆細胞を誘導し、その前駆細胞を先天的にミエリン髄鞘を欠損しているラットの脳や脊髄に移植することで、奇形腫の形成なしにミエリン髄鞘の修復が観察されることが報告されている (O. Brustleら、Science, 285, 754 (1999))。この移植では、上述のEB形成後、ITSFn培地を用いて誘導した神経上皮細胞様の前駆細胞から、さらに分化が進んだグリア細胞の前駆細胞を誘導し移植に用いている。

すなわち、誘導した神経上皮細胞様の前駆細胞をポリオルニチンでコートしたデッシュ上でインスリン、トランスフェリン、プロジェステロン、ブトレシン、塩化セレン、FGF2 (fibroblast growth factor 2)、ラミニンを含む培地で 5 日間培養し、カルシウムおよびマグネシウムを含有していないハンスの



緩衝液を用いて細胞を剥がし、5 分の 1 の細胞密度で FGF2 と EGF (epidermal growth factor) を含む培地で継代培養し、ほぼコンフルエント状態に達したらもう一度 5 分の 1 の細胞密度で FGF2 と PDGF-AA (platelet-derived growth factor-AA) を含む培地に継代し培養を続けることでグリア細胞の前駆細胞へと分化を誘導することが可能であることから、移植に用いることが可能であることが示されている。このようにして分化誘導した細胞は、A2B5 陽性であること (M. C. Raffら、Nature, 303, 390 (1983))、FGF2 および EGF を含まない培地で培養するとアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトへの分化がインビトロで観察されることからグリア細胞の前駆細胞であることが明らかにされている。

上記胚性幹細胞と同様の機能を有する細胞について、胚性幹細胞との関係を以下に説明する。

悪性奇形腫 (teratocarcinoma) より胚性幹細胞と同様多分化能を有する細胞株として、種々の胚性癌腫細胞 (embryonal carcinoma cell: EC細胞) が樹立されている (M. J. Evans; J. Embryol. Exp. Morph., 28, 163 (1972))。

これらの細胞は、胚性幹細胞のマーカーとなる遺伝子を発現していること (E. G. Bernstineら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 3899 (1973); S. B. Diwan and L. C. Steven、J. Natl. Cancer Inst., 57, 937 (1976); D. Solter and B. B. Knowles、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5565 (1978); B. A. Hoslerら、Mol. Cell. Biol., 9, 5623 (1989); S. C. Pruitt、Development, 120, 37 (1994))、インビトロにおいて様々な細胞に分化する能力を有していること (G. R. Martin and M. J. Evans、Cell, 6, 467 (1975); G. R. Martin and M. J. Evans、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1441 (1975); M. W. McBurney、J. Cell. Physiol., 89, 441 (1976))、同系個体への移植において様々な組織からなる奇形種が形成されること (L. J. Kleinsmith and G. B. Pierce、Cancer Res., 24, 797 (1964))、胚盤胞の中に

注入すると胎児形成に寄与しキメラ個体を形成すること (B. Mintz and K. Illmensee, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3538 (1975); V.E. Papaioannouら、Nature, 258, 70 (1975); M.J. Deweyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5564 (1977))、極めて稀ではあるが胚性癌腫細胞株の中には生殖系列キメラを作製する能力を持つ例も報告されていること (T.A. Stewart and B. Mintz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7634 (1981)) から、胚性幹細胞が有する未分化幹細胞としての性質を有した細胞と考えられている。

また、始原生殖細胞を培養する際にbFGFを加えると胚性幹細胞に類似した細胞の細胞株が出現することが示され、EG細胞 (embryonic germ cell) として樹立された (Y. Matsuiら、Cell, 70, 841 (1992); J.L. Resnicら、Nature, 359, 550 (1992))。このEG細胞は、生殖系列キメラの形成に寄与できる能力を有しており (C.L. Stewartら、Devel. Biol., 161, 626 (1994); P.A. Laboskyら、Development, 120, 3197 (1994))、上記胚性幹細胞が有する未分化幹細胞としての性質を有していることが明らかにされている。未分化幹細胞と生殖細胞にはかなり共通した性質があり、増殖や分化の制御状態変化によって比較的容易に相互変換できると考えられている。

一方、発生工学の進歩により、個々人の胚性幹細胞を作成する可能性について報告されている。1997年、Wilmutらによって哺乳動物ではじめて、体細胞の核由来のクローン個体である羊ドリーが作出されて以来 (I. Wilmutら、Nature, 385, 810 (1997))、胎児細胞の核を用いたクローンウシ (J.B. Cibelliら、Science, 280, 1256 (1998))、皮膚、筋肉、耳殻、卵管、卵丘細胞の核を用いたクローンウシ (入谷明; 蛋白質核酸酵素, 44, 892 (1999))、クローンヤギ (A. Baguisiら、Nature Biotechnology, 17, 456 (1999))、卵丘細胞の核を用いたクローンマウス (T. Wakayamaら、Nature, 394, 369 (1998))、雄の尾の細胞を用いたクローンマウス (T. Wakayamaら、Nature Genetics, 22, 127 (1999))、胚性幹細胞の核を用いたクローンマウス (T.

Wakayamaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14984 (1999); W.M. Rideout IIIら、Nature Genetics, 24, 109 (2000)) の作出が報告されており、体細胞の核を、脱核した受精卵に導入することで哺乳動物のクローン個体を作成することが可能であることが示されている。この核移植の技術と胚性幹細胞を樹立する技術を組み合わせることで個々人の胚性幹細胞の作成が可能であり、細胞医療としての臓器移植への応用の可能性が指摘されている (R.P. Lanzaら、Nature Medicine, 5, 975 (1999))。また、胚性幹細胞に遺伝子操作を加えることでより効果的な遺伝子治療を行うことが可能であることや、組織適合性抗原の改変が可能なことも指摘されている (P.D. Rathjenら、Reprod. Fertil. Dev., 10, 31 (1998))。

次に、臓器移植における細胞医療の有効性について例をあげて説明する。

パーキンソン病は、黒質線条体ドーパミン神経細胞の変性を主体とする慢性進行性疾患である。従来より、L-DOPA (L-ジヒドロキシフェニルアラニン) を中心とする内服療法が行われてきたが、長期にわたる内服が必要なため、多くの患者においてその効果が次第に減弱し、wearing off現象、ジスキネジアなどの副作用になやまされるようになる。このため、より有効な治療法の開発が模索され、パーキンソン病患者に対して中絶胎児脳を移植する治療が行われ始めた。全世界では、これまでに、数百例の中絶胎児脳を移植する治療が施行されている。最近、米国では、40 人のパーキンソン病患者を対象に、中絶胎児脳細胞の移植手術の二重盲検試験が行われ、その有用性が証明された。さらに、このような中絶胎児脳細胞移植を受けた患者の中には、10 年以上にもわたって移植した細胞が定着し移植した細胞が線条体とシナプスを形成している例が報告されている。このように、中絶胎児の脳を移植する細胞治療がパーキンソン病に対して高い有効性を示すことが分かってきているが、中絶胎児を利用することに倫理的な問題を指摘する声が強い。また、実際には、一人の患者を治療するのに 10 体近い胎児が必要であるために、現実的な医療への応用に大きな

障害となっている。したがって、ドーパミン作動性神経細胞を、社会通念上許容される方法で、かつ多量に調製する方法の開発が望まれている。

以上のような背景から、多分化能を保持したまま培養可能な未分化幹細胞から目的とする機能性細胞を選択的に、かつ効率的に分化誘導するための方法の開発が注目され、様々な試みがなされている。しかしながら、奇形腫瘍の形成をともしない細胞集団を効率的に分化誘導する方法の開発は、未だ多くの機能細胞において成功していない。また、細胞医療の観点から、目的とする機能細胞を人為的にコントロールされた生理的環境下、例えば、血清やレチノイン酸を用いない培養条件で誘導することが望まれているが、そのような方法も知られていない。特に、外胚葉由来の細胞、具体的には正常な機能を有するドーパミン作動性神経細胞を、未分化幹細胞から効率的に分化誘導し取得する方法は、パーキンソン病をはじめとする脳疾患患者への医療の観点から重要であり切望されているが、未だ開発されていない。

#### 発明の開示

本発明は、細胞および臓器移植医療に利用可能であり、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を選択的且つ効率的に分化誘導する方法、該分化誘導した細胞、並びにこれらの用途を提供することを目的とする。本発明はまた、分化誘導する方法に用いる培地、該分化誘導する方法に用いるストローマ細胞を特異的に認識する抗体および該抗体の製造方法、それにより取得される抗体、該抗体が認識する抗原の取得方法、それにより取得される抗原、並びにこれらの用途を提供することを目的とする。

本発明者らは、胚性幹細胞の分化を引き起こす様々な培養条件を鋭意検討した結果、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する、選択的且つ効率的な方法を見出すことに成功し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、以下の (1)～(71) に関する。

- (1) 胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程を含む、胚性幹細胞を外胚葉細胞に分化誘導する方法。
- (2) 外胚葉細胞が、神経系細胞または表皮系細胞に分化しうる能力を有している細胞である、上記 (1) に記載の方法。
- (3) 胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程を含む、胚性幹細胞を外胚葉由来の細胞に分化誘導する方法。
- (4) 外胚葉由来の細胞が、神経系細胞または表皮系細胞である、上記 (3) に記載の方法。
- (5) 表皮系細胞が表皮細胞である、上記 (4) に記載の方法。
- (6) 神経系細胞が以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる細胞である、上記 (4) に記載の方法。
  - (a) 神経幹細胞；
  - (b) 神経細胞；
  - (c) 神経管の細胞；
  - (d) 神経堤の細胞。
- (7) 神経幹細胞が、ネスチンを発現している神経幹細胞である、上記 (6) に記載の方法。
- (8) 神経細胞が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる神経細胞である、上記 (6) に記載の方法。
  - (a) ドーパミン作動性神経細胞；
  - (b) アセチルコリン作動性神経細胞；
  - (c)  $\gamma$  アミノ酪酸作動性神経細胞；
  - (d) セロトニン作動性神経細胞。
- (9) アセチルコリン作動性神経細胞が、islet 1 を発現している運動神経細胞である、上記 (8) に記載の方法。

(10) 神経管の細胞が、以下の(a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる細胞である、上記 (6) に記載の方法。

(a) 神経管の腹側化因子であるソニックヘッジホック (Sonic hedgehog) に反応し腹側に位置する細胞に分化し、かつ神経管の背側因子である骨形成因子 4 (Bone Morphogenetic Protein 4) に反応し背側に位置する細胞に分化する能力を有する、背腹軸が決定される前の段階の神経管の細胞；

(b) 神経管の最も腹側の底板に位置する HNF-3  $\beta$  (Hepatocyte Nuclear Factor-3  $\beta$ ) を発現している神経管腹側の細胞；

(c) 神経管の腹側から HNF-3  $\beta$  (Hepatocyte Nuclear Factor-3  $\beta$ ) について 2 番目に存在するマーカー Nkx2.2 を発現している神経管腹側の細胞；

(d) Pax-7 を発現している神経管背側の細胞。

(11) 神経堤の細胞が、AP-2 (Activator Protein 2) を発現している細胞である、上記 (6) に記載の方法。

(12) 骨形成因子 4 (Bone Morphogenetic Protein 4) 存在下で培養することを特徴とする、上記 (1)～(11) のいずれか 1 項に記載の方法。

(13) ソニックヘッジホック (Sonic hedgehog) 存在下で培養することを特徴とする、上記 (1)～(12) のいずれか 1 項に記載の方法。

(14) 非凝集状態が、エンブリオイドボディを介さない状態である、上記 (1)～(13) のいずれか 1 項に記載の方法。

(15) 無血清培養の条件下で培養する工程を含むことを特徴とする、上記 (1)～(14) のいずれか 1 項に記載の方法。

(16) ストローマ細胞由来の因子の存在下で培養することを特徴とする、上記 (1)～(15) のいずれか 1 項に記載の方法。

(17) ストローマ細胞存在下で培養することを特徴とする、上記 (1)～(16) のいずれか 1 項に記載の方法。

(18) ストローマ細胞が、物理化学的处理により増殖能力を失ったストローマ細胞である、上記 (17) に記載の方法。

(19) 物理化学的处理が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる処理である、上記 (18) に記載の方法。

(a) 抗癌剤による処理；

(b) 放射線の照射による処理；

(c) 病理診断で用いられる組織固定のための処理。

(20) 抗癌剤が、マイトマイシンC、5-フルオロウラシル、アドリアマイシンおよびメトトレキセートからなる群から選ばれる抗癌剤である、上記 (19) に記載の方法。

(21) 病理診断で用いられる組織固定のための処理が、マイクロウェーブ固定、急速凍結置換固定、グルタルアルデヒド固定、パラフォルムアルデヒド固定、ホルマリン固定、アセトン固定、ブアン固定、過ヨウ素酸固定、メタノール固定およびオスミウム酸固定からなる群から選ばれる処理である、上記 (19) に記載の方法。

(22) ストローマ細胞が、ハイブリドーマFERM BP-7573 が産生するモノクローナル抗体で認識されるストローマ細胞である上記 (16)～(21) のいずれか 1 項に記載の方法。

(23) ストローマ細胞が、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) および (g) からなる群から選ばれるストローマ細胞である、上記 (16)～(22) のいずれか 1 項に記載の方法。

(a) 胎児初代培養繊維芽細胞；

(b) SIHMマウス由来STO細胞；

(c) マウス胎児由来NIH/3T3 細胞；

(d) M-CSF欠損マウス頭蓋冠由来OP9 細胞；

(e) マウス頭蓋冠由来MC3T3-G2/PA6 細胞；

- (f) 胚性幹細胞由来のストローマ細胞；
  - (g) 骨髄間葉系幹細胞由来のストローマ細胞。
- (24) 胚性幹細胞が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれた細胞である、上記 (1)～(23) のいずれか 1 項に記載の方法。
- (a) 着床以前の初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞；
  - (b) 体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞；
  - (c) (a) または (b) の胚性幹細胞の染色体上の遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて改変した胚性幹細胞。
- (25) 培養工程にレチノイン酸を添加しないことを特徴とする、上記 (1)～(24) のいずれか 1 項に記載の方法。
- (26) 胚性幹細胞を外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞に分化誘導する効率が 5%以上である、上記 (1)～(25) のいずれか 1 項に記載の方法。
- (27) 実質的に中胚葉系細胞の分化誘導を伴わない、上記 (1)～(26) のいずれか 1 項に記載の方法。
- (28) 上記 (1)～(27) のいずれか 1 項に記載の方法で用いる、胚性幹細胞を外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導するための培地。
- (29) 胚性幹細胞を外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する、ストローマ細胞由来の因子。
- (30) ムコ多糖吸着能を有する、上記 (29) に記載の因子。
- (31) ムコ多糖がヘパリンである、上記 (30) に記載の因子。
- (32) 骨形成因子 4 (Bone Morphogenetic Protein 4) を有効成分として含有する、外胚葉細胞から表皮系細胞への分化誘導剤。
- (33) 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞または該細胞由来の因子を有効成分として含む、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞への分化誘導剤。



(34) ストローマ細胞が、上記 (18)～(23) のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、上記 (33) に記載の分化誘導剤。

(35) ストローマ細胞由来の因子がムコ多糖吸着能を有する、上記 (33) または (34) に記載の分化誘導剤。

(36) ムコ多糖がヘパリンである、上記 (35) に記載の分化誘導剤。

(37) 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞を、ムコ多糖を含む培地中で培養して得られる培養上清を含む培地。

(38) ストローマ細胞が、上記 (18)～(23) のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、上記 (37) に記載の培養上清を含む培地。

(39) ムコ多糖がヘパリンである、上記 (37) または (38) に記載の培養上清を含む培地。

(40) 上記 (37)～(39) のいずれか 1 項に記載の培養上清を有効成分として含む、外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞の分化誘導剤。

(41) ストローマ細胞を免疫原として用いることを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞を特異的に認識する抗体を取得する方法。

(42) ストローマ細胞が、上記 (18)～(23) のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、上記 (41) に記載の方法。

(43) 上記 (41) または (42) に記載の方法により取得される、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞を特異的に認識する抗体。

(44) ハイブリドーマFERM BP-7573 が産生するモノクローナル抗体。

(45) 上記 (43) または (44) に記載の抗体を用いることを特徴とする、該抗体が認識する抗原を取得する方法。

(46) 上記 (45) に記載の方法により取得される、上記 (43) または (44) に記載の抗体が認識する抗原。

(47) 上記 (46) に記載の抗原を含む細胞培養のための培地。

(48) 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を指標に、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞へ分化誘導する活性を有するストローマ細胞由来の因子を取得する方法。

(49) ムコ多糖とストローマ細胞由来の因子とを結合させる工程と、ムコ多糖に結合した該ストローマ細胞由来の因子から該因子を回収する工程を含む、上記 (48) に記載の方法。

(50) ストローマ細胞が、上記 (18)～(23) のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、上記 (48) または (49) に記載の方法。

(51) ムコ多糖が、ヘパリンである、上記 (49) に記載の方法。

(52) 上記 (1)～(27) のいずれか 1 項に記載の方法を用いることによって誘導される、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞。

(53) 上記 (52) に記載の外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を、抗癌剤を含む培地中で培養する工程を含むことを特徴とする、胚性幹細胞から分化誘導された細胞の純度を高める方法。

(54) 抗癌剤が、マイトマイシンC、5-フルオロウラシル、アドリアマイシン、メトトレキセートおよびアラCからなる群から選ばれる抗癌剤である、上記 (53) に記載の方法。

(55) 上記 (53) または (54) に記載の方法を用いて得られる細胞。

(56) 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、上記 (1)～(27) のいずれか 1 項に記載の方法を行い、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程を比較することを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程における調節に関連する物質の評価方法。

(57) 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、上記 (1)～(27) のいずれか 1 項に記載の方法を行い、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程を比較することを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程における調節に関連する物質のスクリーニング方法。

(58) 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、上記 (52) に記載の細胞を培養し、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能を比較することを特徴とする、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能の調節に関連する物質の評価方法。

(59) 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、上記 (52) に記載の細胞を培養し、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能を比較することを特徴とする、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能の調節に関連する物質のスクリーニング方法。

(60) 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞または該細胞由来の因子を含む医薬。

(61) ストローマ細胞が、上記 (18)～(23) のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、上記 (60) に記載の医薬。

(62) 因子がムコ多糖吸着能を有する、上記 (60) に記載の医薬。

(63) ムコ多糖がヘパリンである、上記 (62) に記載の医薬。

(64) 上記 (43) または (44) に記載の抗体を含む医薬。

(65) 上記 (46) に記載の抗原を含む医薬。

(66) 上記 (52) または (55) に記載の細胞を含む医薬。

(67) 外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の診断、予防および／または治療のための医薬である、上記 (60)～(66) のいずれか 1 項に記載の医薬。

(68) 外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患が、神経系細胞または表皮系細胞の障害に基づく疾患である、上記 (67) に記載の医薬。

(69) 神経系細胞の障害に基づく疾患が、アルツハイマー病、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、虚血性脳疾患、てんかん、脳外傷、背堆損傷、運動神経疾患、神経変性疾患、網膜色素変性症、内耳性難聴、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、または神経毒物の障害に起因する疾患であり、表皮系細胞の障害に基づく疾患が火傷、外傷、創傷治癒、床擦れ、または乾せんである、上記(68)に記載の医薬。

(70) 上記(43)または(44)に記載の抗体を用いることを特徴とする、上記(46)に記載の抗原の免疫学的検出法。

(71) 上記(43)または(44)に記載の抗体を用いることを特徴とする、上記(46)に記載の抗原の免疫組織染色法。

以下、本発明の実施態様および実施方法について詳細に説明する。

## 1. 本発明の分化誘導方法

### (1) 適用動物

本発明に係わる適用動物としては、脊椎動物、中でも温血動物、さらにはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ヤギ、サル、ヒト等の哺乳動物があげられる。

### (2) 胚性幹細胞

胚性幹細胞とは、インビトロにおいて培養することが可能で、かつ、生体を構成するすべての細胞に分化しうる多分化能を有する細胞を包含する。その例としては、(a) 着床以前の初期胚を培養することによって樹立した哺乳動物等の胚性幹細胞が挙げられ、具体的には、初期胚を構成する内部細胞塊より樹立されたES細胞、始原生殖細胞から樹立されたEG細胞、着床以前の初期胚の多分化能を有する細胞集団（例えば、原始外胚葉）から単離した細胞、あるいはそ

の細胞を培養することによって得られる細胞があげられる。悪性奇形腫より樹立されたEC細胞もES細胞と同様の性質を示すことが知られていることから、着床以前の初期胚を培養することによって樹立した哺乳動物等の胚性幹細胞に広義に含まれる。

本発明における胚性幹細胞としては、上記 (a) の胚性幹細胞、(b) 体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞、および (c) (a) あるいは (b) の胚性幹細胞の染色体上の遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて改変した胚性幹細胞を包含する。

### (3) 外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞

本発明の分化誘導法によって、上述のような胚性幹細胞を非凝集状態で培養することにより、胚性幹細胞を外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞に分化誘導することができる。

本発明において、外胚葉細胞とは、神経系細胞や表皮系細胞に分化しうる能力を有した細胞から構成される胚葉細胞を包含する。その例としては、原始外胚葉から分化した胎児の外胚葉細胞があげられる。

本発明において、外胚葉由来の細胞とは、外胚葉細胞から分化した細胞で、かつ生体を構成する機能細胞を包含する。その具体例としては、神経系細胞や表皮系細胞があげられる。すなわち、本発明の方法によって、外胚葉細胞を神経系細胞または表皮系細胞へ誘導することができる。

#### (a) 神経系細胞

神経系細胞としては、神経幹細胞、神経細胞、神経管の細胞、神経堤の細胞などがあげられる。

(i) 神経細胞

神経細胞とは、他の神経細胞あるいは刺激受容細胞からの刺激を受け別の神経細胞、筋あるいは腺細胞に刺激を伝える機能を有する細胞を意味する。

神経細胞は、神経細胞が産生する神経伝達物質の違いにより分類されており、具体的には、神経伝達物質、神経伝達物質の合成酵素などの違いで分類されている。神経伝達物質としては、ペプチド性、非ペプチド性のいずれも包含される。非ペプチド性の神経伝達物質としては、ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン、セロトニン、アセチルコリン、 $\gamma$ アミノ酪酸、グルタミン酸があげられる。ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンの3種類をカテコールアミンと称す。

これらの神経伝達物質で分類される神経細胞としては、例えば、ドーパミン作動性神経細胞、アセチルコリン作動性神経細胞、 $\gamma$ アミノ酪酸作動性神経細胞、セロトニン作動性神経細胞、ノルアドレナリン作動性神経細胞、アドレナリン作動性神経細胞、グルタミン酸作動性神経細胞などがあげられる。ドーパミン作動性神経細胞、ノルアドレナリン作動性神経細胞、アドレナリン作動性神経細胞を総称してカテコールアミン作動性神経細胞と呼ぶ。

カテコールアミン作動性神経細胞は共通してチロシン水酸化酵素を発現し、ノルアドレナリン作動性神経細胞とアドレナリン作動性神経細胞では共通してドーパミン- $\beta$ -ヒドロキシラーゼを発現する。また、ノルアドレナリン作動性神経細胞ではフェニルエタノールアミン N-メチルトランスフェラーゼを発現し、セロトニン作動性神経細胞ではトリプトファン ヒドロキシラーゼを発現し、アセチルコリン作動性神経細胞ではコリンアセチルトランスフェラーゼを発現し、 $\gamma$ アミノ酪酸作動性神経細胞ではグルタミン酸デカルボキシラーゼをそれぞれ特異的に発現している。したがって、神経細胞を認識する方法としては、上記酵素を認識する抗体を用いた識別方法、上記酵素をコードするmRNAの発現を検出する方法などがあげられる。

ペプチド性の神経伝達物質としては、副腎皮質刺激ホルモン (Corticotropin (ACTH))、 $\alpha\alpha\gamma$ ,  $\beta$ -リポトロピン (Lipotropin)、 $\alpha$ -メラニン細胞刺激ホルモン (MSH)、 $\alpha$ -エンドルフィン (Endorphin)、 $\beta$ -エンドルフィン、 $\gamma$ -エンドルフィン、メチオニンエンケファリン (Met-Enkephalin)、ロイシンエンケファリン (Leu-Enkephalin)、 $\alpha$ -ネオエンドルフィン (Neoendorphin)、 $\beta$ -ネオエンドルフィン、ダイノルフィンA (Dynorphin A)、ダイノルフィンB (Dynorphin B)、ロイモルフィン (Leumorphin)、バソプレッシン (Vasopressin)、ニューロフィシン (Neurophysin)、オキシトシン (Oxytocin)、ニューロフィシンI (Neurophysin I)、サブスタンスP (Substance P)、ニューロキニンA (Neurokinin A)、神経ペプチドK (Neuropeptide K)、神経ペプチド $\gamma$  (Neuropeptide- $\gamma$ )、ニューロキニンB (Neurokinin B)、ボンベシン (Bombesin)、ガストリン放出ペプチド (Gastrin-releasing peptide)、セクレチン (Secretin)、モチリン (Motilin)、グルカゴン (Glucagon)、バソアクチブインテスティナルペプチド (Vasoactive intestinal peptide)、成長ホルモン放出因子 (Growth hormone-releasing factor)、インスリン (Insulin)、インスリン様増殖因子 (Insulin-like growth factors)、ソマトスタチン (Somatostatin)、ガストリン (Gastrin)、コレシストキニン (Cholecystokinin)、神経ペプチドY (Neuropeptide Y)、膵臓ポリペプチド (Pancreatic polypeptide)、ペプチドYY (Peptide YY)、副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (Corticotropin-releasing factor)、カルシトニン (Calcitonin)、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (Calcitonin gene-related peptide)、アンギオテンシン (Angiotensin)、ブラジキニン (Bradykinin)、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (Thyrotropin-releasing hormone)、ニューロテンシン (Neurotensin)、ガラニン (Galanin)、黄体形成ホルモン放出ホルモン (Luteinizing hormone-releasing hormone) があげられる。これらのペプチド性神経伝達物質を産生する神経細胞は、神経

伝達物質あるいは神経伝達物質前駆ペプチドを認識する抗体、神経伝達物質あるいは神経伝達物質前駆ペプチドをコードするmRNAの発現を検出することで識別することができる。

また、運動神経は、その神経終末よりアセチルコリンを分泌することで骨格筋に情報を伝えており、アセチルコリン作動性神経細胞に分類される。運動神経のマーカー蛋白質としては、islet 1 (O. Karlsson ら、Nature, 344, 879, 1990) があげられる。

本発明の分化誘導法は、神経細胞、好ましくはドーパミン作動性神経細胞、アセチルコリン作動性神経細胞、γアミノ酪酸作動性神経系細胞、セロトニン作動性神経細胞への分化誘導に好適に用いられる。

特に、本発明の方法により胚性幹細胞から誘導されたドーパミン作動性神経細胞とは、前述したようにカテコールアミン作動性神経細胞に共通して発現が観察されるチロシン水酸化酵素を発現しているが、ノルアドレナリン作動性神経細胞とアドレナリン作動性神経細胞に共通して発現が観察されるドーパミン-β-ヒドロキシラーゼを発現しない細胞として特徴づけられ、移植により神経変性疾患、例えばパーキンソン病の症状を改善する能力を有する。

## (ii) 神経幹細胞

神経幹細胞とは、神経細胞 (neuron)、アストロサイト (astrocyte) およびオリゴデンドロサイト (oligodendrocyte) に分化しうる能力を有し、かつ自己複製能力を有する細胞として定義される。胚性幹細胞のようにすべての細胞に分化する多分化能は有していないが、脳内において神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを供給する機能を有している。

したがって、神経幹細胞であることを確認する方法としては、実際に脳に移植してその分化能を確認する方法、インビトロで神経幹細胞が神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化誘導して確認する方法などがあげら



える (Mol. Cell. Neuro Science, 8, 389 (1997); Science, 283, 534 (1999))。

また、このような機能を有した神経幹細胞は、神経前駆細胞での発現が確認されている細胞骨格蛋白質ネスチンを認識する抗ネスチン抗体で染色可能である (R. McKay, Science, 276, 66 (1997))。したがって抗ネスチン抗体で染色することにより神経幹細胞を確認することもできる。

### (iii) 神経管および神経堤の細胞

脊索動物の初期発生においては、原始外胚葉 (primitive ectoderm) 層に原条 (primitive streak) が現れ神経誘導 (neural induction) が開始される。神経誘導とは、初期胚の背側に位置する外胚葉が隣接あるいは内側部分に位置するオーガナイザー領域よりシグナルを受けて神経性外胚葉へと分化する過程を意味する。この神経誘導によって形成された神経性外胚葉は非神経性外胚葉、すなわち表皮外胚葉から独立して神経板 (neural tube) となり、これがやがて腹側に陥入して神経管 (neural tube) を形成する。神経板と表皮外胚葉との間の部分に位置する外胚葉部分は陥入の際、神経堤 (neural crest) を形成する。神経管を構成する一層の神経上皮組織から中枢神経系のすべての細胞群が発生する。すなわち、神経管の前方部は拡大して脳の前基となる脳胞 (brain vesicle) を形成し、後方部は管のままで脊髄に分化していく。神経堤は中枢神経そのものの分化には直接関与せず、神経堤を構成する細胞は移動して種々の組織、例えば脳・脊髄神経節、交感神経およびその神経節、副腎髄質、あるいはメラニン色素細胞などに分化する。

神経管の細胞とは、上述の発生過程における神経管を構成する細胞を意味する。

神経堤の細胞とは、上述の発生過程における神経堤を構成する細胞を意味する。

本発明の分化誘導法は、神経管の細胞、神経堤の細胞への分化誘導に好適に用いられる。

本発明の方法により胚性幹細胞から誘導された神経管の細胞は、神経管の腹側化因子であるソニックヘッジホック (Sonic hedgehog、以下「shh」と略す) に反応し腹側に位置する細胞に分化し、かつ神経管の背側因子である骨形成因子 4 (Bone Morphogenetic Protein 4、以下「BMP4」と略す) に反応し背側に位置する細胞に分化する能力を有する、背腹軸が決定される前の段階の神経管の細胞として特徴づけられる細胞を包含する。また、該細胞が分化し、神経管の最も腹側の底板に位置するマーカーHNF-3 $\beta$  (Hepatocyte Nuclear Factor-3 $\beta$ 、以下「HNF-3 $\beta$ 」と略す) を発現している神経管腹側の細胞、神経管の腹側から HNF-3 $\beta$  について 2 番目に存在するマーカーNkx2.2 を発現している神経管腹側の細胞、および Pax-7 を発現している神経管背側の細胞も、本発明の方法により胚性幹細胞から誘導された神経管の細胞として含まれる。

本発明の方法により胚性幹細胞から誘導された神経堤の細胞は、AP-2 (Activator Protein 2、以下「AP-2」と略す) を発現している細胞として特徴づけられる細胞を包含する。

Shh は、神経管の背腹軸の形成、肢芽の前後軸の形成など発生初期の形態形成に関わる分泌性の因子である (C. Chiang ら、Nature, 383, 407 (1996); M. Bitgood ら、Curr. Biol., 6, 298 (1996))。

BMP4 は、神経管の背腹軸の形成、中胚葉背腹軸の形成など背側化因子として作用する、発生初期の形態形成に関与する分泌性の因子である (J.M. Graff ら、Cell, 79, 169 (1994); A. Suzuki ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 10255 (1994))。

HNF-3 $\beta$  は、生後の肝、小腸、肺、膵ランゲルハンス島で発現していることが知られているが、発生過程では、前腸形成期以降の腸上皮や肝原基、または、原腸陥入期を通じて、原口背唇部、前脊索板、脊索、神経管腹側中央部などのオーガナイザー領域などで発現しており、発生時には神経管や体節の体軸パターン形成のためのシグナルをコントロールする重要な因子であることが知られ

ている (C. Vaisse ら、Diabetes, 46, 1364 (1997); M. Levinson-Dushnik ら、Mol. Cell. Biol., 17, 3817 (1997))。

Nkx2.2 は、発生過程において、神経管の腹側に発現している因子であり、これら細胞の分化や機能に重要な役割を担う因子であることが知られている (M. Price ら、Neuron, 8, 241 (1992))。

Pax-7 は、神経管において背側部に限局して発現し (B. Jostes ら、Mech. Dev., 33, 27 (1990))、頭部の神経堤由来の組織、中枢神経系の分化形成において重要な役割を担う因子である (A. Mansouri ら、Development, 122, 831 (1996))。

AP-2 は、胎生 8.5 日から 12.5 日のマウス胚で、神経堤細胞とそれに由来する主要な組織である頭部の知覚神経節、脊髄神経節及び顔面の間葉に発現し、これら細胞の分化や機能に重要な役割を担う因子である (H. Schorle ら、Nature, 381, 235 (1996)、J. Zhang ら、Nature, 381, 238 (1996))。神経堤細胞に発現し頭蓋閉鎖に関与する AP2 以外の転写因子としては Pax-3 と twist があげられる。

これら神経管および神経堤の細胞は、そのマーカー遺伝子およびこれら細胞の発生の方向性に影響を与える因子が知られており、マーカー遺伝子の mRNA の検出、発現マーカー遺伝子産物そのものの検出、あるいは該因子に対する応答を調べることで細胞を特定することができる。

#### (b) 表皮系細胞

表皮系細胞としては、表皮細胞などがあげられる。

皮膚は、外胚葉に由来する上皮組織の表皮 (epidermis) と、中胚葉に由来する結合組織の真皮 (dermis) から構成されており、表皮細胞とは、表皮を構成する上皮細胞として定義される。表皮は、基本的には角化した重層扁平上皮からなり、真皮から外表に向かって基底層 (stratum basale)、有棘層 (stratum

spinosum)、顆粒層 (stratum granulosum)、淡明層 (stratum lucidum)、角質層 (stratum corneum) からなる。表皮細胞は、細胞の形態とケラチンフィラメントの発現様式を指標として分類される。ケラチン 8 と 18 は発生の段階の初期に発現するので、胎児初期における上皮細胞のマーカーとして用いられる (R.G. Oshimaら、Dev. Bio., 99, 447 (1983))。ケラチン 19 は胎児における上皮細胞のマーカーとして用いられる (P.C. Stasiak & E.B. Lane、Nucleic Acids Res., 15, 10058 (1987))。ケラチン 5 と 14 は表皮の基底層を構成する上皮細胞のマーカーとして用いられる (E. Fuchs & H. Green、Cell, 19, 1033 (1980))。角化中の表皮細胞はケラチノサイトと呼ばれ、角化に伴いケラチン 5 や 14 の発現が減少し代わりにケラチン 1 や 10 の発現が上昇する (E. Fuchs & H. Green、Cell, 19, 1033 (1980); C. Baguttiら、Dev. Biol., 179, 184 (1996))。

表皮系細胞、特に表皮細胞の識別は、上記各ケラチンに対する抗体や非神経外胚葉細胞のマーカーであるEカドヘリンに対する抗体で検出したり、またはこれらケラチンのタンパク質のmRNAを検出することで行うことができる。

本発明の方法により、好適に、高い細胞分裂能を有する基底層部の表皮細胞へ分化誘導することができる。

#### (4) 非凝集状態での胚性幹細胞の培養

本発明の分化誘導法としては、具体的には、単一細胞状態の胚性幹細胞を調製する工程、該胚性幹細胞をストローマ細胞あるいはストローマ細胞由来の因子を存在させて、非凝集状態で培養する工程を含む方法があげられる。

ここで、ストローマ細胞とは、後述の 4 に記載のストローマ細胞であり、ストローマ細胞由来の因子とは、後述の 8 に記載の抗原、後述の 5 の方法で得られる因子、ストローマ細胞の培養上清、ストローマ細胞の細胞断片等である。

胚性幹細胞を非凝集状態で培養するとは、細胞同士の接着を解除した単一細胞状態 (single cell) で培養を開始し、継続して培養することである。単一細胞状態とは、酵素消化等を施すことで細胞同士の接着がない個々の細胞がバラバラになった状態をいう。

この培養では、播種した細胞が凝集せず、エンブリオイドボディを形成しない。このような単一細胞状態で胚性幹細胞の培養を開始し、それを継続して培養するには、胚性幹細胞の培養において通常の胚性幹細胞の継代に用いられる細胞密度よりも低い細胞密度で播種し培養することで行うことができる。即ち、酵素消化等の処理を胚性幹細胞に施し、培地を用いて単一細胞状態の細胞懸濁液を調製し、その細胞懸濁液を、培養系にお互いの細胞が接触しない状態で存在できる程度に培養する。このような培養は、細胞を積極的に凝集させ擬似胚状態を再現することで分化誘導を引き起こそうとするエンブリオイドボディを用いた従来の培養方法とは根本的に考え方を異にするものである。ここで、培養系にお互いの細胞が接触しない状態で存在できる程度の播種用胚性幹細胞の細胞密度としては、好ましくは数十～数百細胞/cm<sup>2</sup>であり、より好ましくは 30～300 細胞/cm<sup>2</sup>である。

単一細胞状態の胚性幹細胞を取得する方法としては、組織細胞培養で用いられている、公知の酵素消化の方法があげられる。具体的には、前日培地交換を行い、数十%～ほぼコンフルエント状態にまで増殖した胚性幹細胞を培養している培養皿から培地を除いた後、リン酸緩衝生理食塩水溶液（以下、「PBS」と称す）を用いて数回、好ましくは 2～3 回洗浄する。洗浄後、胚性幹細胞の入った培養皿に適当な酵素消化液（例えば、1mM EDTAおよび 0.25%トリプシンを含むPBS）を加え、37℃で数十分間、好ましくは 5～20 分間培養する。酵素反応後、後述の 2 で調製した培地に懸濁し、遠心操作（例えば、4℃、200×g で 5 分間）を行ない、胚性幹細胞を再び培地に懸濁することにより、単一細胞状態の胚性幹細胞を回収することができる。

胚性幹細胞の培養方法としては、マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル; Methods in Enzymology, volume 225, Guide to Techniques in Mouse Development, Academic Press (1993); ES細胞を用いた変異マウスの作製、等に記載の胚性幹細胞を培養するための方法があげられる。また、無血清培養することも可能で、例えば、Dulbecco MEM 培地に 15~20%のKNOCKOUT™ SR (GIBCOBRL社製)、2mMグルタミン、100  $\mu$ M MEM Non-Essential Amino Acids溶液、50U/mlペニシリン、50U/mlストレプトマイシン、100  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール、および 1,000U/ml LIFを加えた培地を用い、未分化な胚性幹細胞としての形質を保ったまま継代培養することができる (M. D. Goldsboroughら、Focus, 20, 8 (1998))。

本発明の、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する培養方法としては、用いる胚性幹細胞の分化誘導に適した培養方法であればいずれも用いることができる。例えば、単層培養法、支持細胞との共培養法、高密度維持培養法、マイクロキャリア培養法、還流培養法、軟寒天培養法等をあげることができる。具体的には、単一細胞状態とした胚性幹細胞を後述の 2 で調製した培地中で培養する方法、後述の 2 で調製した培地中に懸濁した単一細胞状態の胚性幹細胞を、あらかじめ後述の 4 で調製したストローマ細胞と非凝集状態で数日間共培養する方法などがあげられる。

本発明の、胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程は、無血清培養条件下で行われることが好ましいが、無血清培養条件下で行われた後に、血清を添加した培養条件で培養する工程 (例えば、後述の 2 で記載した基礎培地に、好ましくは数十%、より好ましくは 5~20%の哺乳類血清を添加した培地を用い、37℃で数%、好ましくは 5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養する工程) を行うこともできる。特に表皮系細胞に分化誘導させる場合には、この血清を添加した培養条件で培養する工程を含むことにより、分化誘導率をより高くすることができる。

上記方法により、本発明の外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞を得ることができる。本発明の方法により、胚性幹細胞は外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞へ分化誘導され、本発明の分化誘導法に供した胚性幹細胞の 5%以上、好ましくは 15%以上、より好ましくは 40%以上、さらに好ましくは 80%以上を外胚葉系の細胞（外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞）へ分化誘導することができる。

外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞を神経系細胞に分化誘導するには、上述の工程を含む方法で適宜培地交換を行ないながら培養を継続することで行うことができる。

外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を表皮系細胞に分化誘導するには、BMP4 を上述の工程を含む培養系に添加することが好ましい。

外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞から神経管又は神経堤の細胞に分化誘導するには、BMP4 を含まない培地を用いて上述の工程を行い、胚性幹細胞が神経性外胚葉へ分化を開始した後（例えば、培養開始から 1~14 日、好ましくは 2~8 日、より好ましくは 4~6 日後）、shh や BMP4 を含む培地を用いて適宜培地交換を行いながら培養を継続することで行うことができる。

#### (5) ストローマ細胞存在下での培養

本発明の分化誘導方法は、ストローマ細胞あるいはストローマ細胞由来の因子の存在下で胚性幹細胞を培養することが好ましい。

ストローマ細胞は、後述の 4 に記載のとおりであり、ストローマ細胞由来の因子としては、後述の 8 に記載の抗原、後述の 5 の方法で得られる因子、ストローマ細胞の培養上清、ストローマ細胞の細胞断片等があげられる。

本発明の分化誘導法において、ストローマ細胞と胚性幹細胞の培養系での比率は、胚性幹細胞を外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞に分化誘導することが可能である比率であればいかなる比率でもよいが、 $10^4 \sim 1$  対 1（ストローマ

細胞数対胚性幹細胞数)、好ましくは $10^3 \sim 1$ 対1、より好ましくは $10^2 \sim 10$ 対1である。

ここで、胚性幹細胞とストローマ細胞との共培養としては、胚性幹細胞とストローマ細胞とが物理的に接触している場合や、両細胞が同じ培養系に存在するが物質の行き来が可能な隔壁により隔てられ細胞自体の物理的接触ができない場合も含まれる。

胚性幹細胞とストローマ細胞が同じ培養系に存在するが物質の行き来が可能な隔壁により隔てられ細胞自体の物理的接触ができない場合とは、例えば、通常の細胞培養に用いられるフィルターを用いて両細胞を隔てて培養する場合があげられる。フィルターの孔径としては、好ましくは $0.01 \sim$ 数十 $\mu\text{m}$ 、より好ましくは $0.02 \sim 12 \mu\text{m}$ が好ましい。このようなフィルターとしては、具体的には、メンブレンカルチャーインサート（岩城硝子社製）、NuncTCインサート（Nunc社製）、CO-CULTUREシャーレ（グライナー社製）、セルカルチャーインサート（ファルコン社製）、ケモタキシスチャンバー（Neuro Probe Inc. 社製）等をあげることができる。胚性幹細胞とストローマ細胞のどちらをフィルター上に培養しても構わないが、ストローマ細胞をフィルター上で培養する方が好ましい。

胚性幹細胞とストローマ細胞とを共培養し、胚性幹細胞から外胚葉細胞および神経系細胞を分化誘導する方法としては、具体的には、回収した胚性幹細胞を後述の2で調製した培地（例えば、Glasgow MEM培地に10%のKNOCKOUT™ SR（GIBCOBRL社製）、2mMグルタミン、50U/mlペニシリン、50U/mlストレプトマイシン、100 $\mu\text{M}$  MEM Non-Essential Amino Acids溶液、1mMピルビン酸および100 $\mu\text{M}$  2-メルカプトエタノールを添加した培地）に懸濁し、後述の4で調製したストローマ細胞が培養されている培養器（例えば、細胞培養用フラスコ）に、数十～数百細胞/ $\text{cm}^2$ 、好ましくは100細胞/ $\text{cm}^2$ の細胞密度で播種し、5～20日



間、好ましくは 7~10 日間 37℃で数%、好ましくは 5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub>インキュベーターにて培養する方法をあげることができる。

胚性幹細胞とストローマ細胞とを共培養し、胚性幹細胞から外胚葉細胞および表皮系細胞を分化誘導する方法としては、具体的には、回収した胚性幹細胞を 2 で調製した培地（例えば、Glasgow MEM培地に 10%のKNOCKOUT™ SR (GIBCOBRL社製)、2mMグルタミン、50U/mlペニシリン、50U/mlストレプトマイシン、100 μM MEM Non-Essential Amino Acids溶液、1mMピルビン酸、100 μM 2-メルカプトエタノールおよび 0.1~100ng/ml、好ましくは 1~50ng/mlの濃度のBMP4 を添加した培地）に懸濁し、後述の 4 で調製したストローマ細胞が培養されている培養器（例えば、細胞培養用フラスコ）に、数十~数百細胞/cm<sup>2</sup>、好ましくは 100 細胞/cm<sup>2</sup>の細胞密度で播種し、5~20 日間、好ましくは 7~10 日間 37℃で数%、好ましくは 5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub>インキュベーターにて培養する方法をあげることができる。

また、胚性幹細胞とストローマ細胞とを共培養する代わりに、胚性幹細胞を培養する培地中にOP9 細胞（T. Nakanoら、Science, 272, 722 (1996))、NIH/3T3 細胞（J.L. Jainchillら、J. Virol., 4, 549 (1969))、またはMC3T3-G2/PA6 細胞の培養上清を添加した培地を用いることで、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導することもできる。さらにまた、胚性幹細胞とストローマ細胞とを共培養する代わりに、培地中にOP9 細胞、NIH/3T3 細胞、MC3T3-G2/PA6 細胞（H. Kodamaら、J. Cell. Physiol., 112, 89 (1982))、STO細胞（G. Martin、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7634 (1981); M.J. Evansら、Nature, 292, 154 (1981))、または胎児初代培養繊維芽細胞（マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル、ジーン・ターゲッティング; ES細胞を用いた変異マウスの作製）が産生している因子を添加した培地を用いることで、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導することもできる。

(6) レチノイン酸を用いない培養

本発明の分化誘導法では、胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程において、レチノイン酸を用いずに培養することが好ましい。

ここで、「レチノイン酸を用いずに培養する」とは、非生理的な濃度のレチノイン酸を用いずに培養することである。非生理的な濃度とは、生体に生理的に存在する濃度の10倍以上の濃度を意味する。具体的には、通常ヒトの血中には約  $10^{-8}$  mol/l の濃度のレチノイン酸が存在することが知られていることから（生化学辞典第2版，東京化学同人（1992））、 $10^{-7}$ ～ $10^{-6}$  mol/l の濃度範囲が非生理的な濃度である。レチノイン酸は発生分化の際に形態形成に影響を及ぼす形態形成物質（モルフォゲン）として作用を有しており、また細胞種によっては毒性なども強く、非生理的な濃度のレチノイン酸を用いた培養系を医療へ応用する際には二次的な副作用が懸念されている。従って、レチノイン酸を用いないで培養することは、上述のレチノイン酸使用にともなうリスクを回避することができるため有用である。

(7) 中胚葉系細胞の分化が実質的に誘導されない培養

本発明の分化誘導法において、培養系に中胚葉系細胞の分化が実質的に誘導されないことが好ましい。

ここで、「中胚葉系細胞の分化が実質的に誘導されない」とは、培養系に分化してくる中胚葉系細胞の割合が、培養系全体の細胞数に対して5%以下であることを意味し、好ましくは2%以下である。

ここで、中胚葉系細胞とは、筋肉系、結合組織、骨格系、循環器系、泌尿器系、生殖系などの器官や組織を構成する細胞を意味する。

中胚葉系細胞を識別するには、中胚葉系細胞を特異的に認識する抗体で検出する方法、中胚葉系細胞で特異的に発現しているタンパク質のmRNAを検出する

方法、そのタンパク質を特異的に認識する抗体を用いて検出する方法等を用いて行うことができる。

#### (8) 培養器

本発明で利用できる培養器としては、胚性幹細胞を培養できるものであればいかなる培養器でも用いることができるが、好ましくは細胞培養用に用いられる培養器が望ましい。細胞培養用の培養器としては、例えば、フラスコ、組織培養用フラスコ、デッシュ、ペトリデッシュ、組織培養用デッシュ、コンツァーデッシュ、パーマノックスデッシュ、マルチデッシュ、マイクロプレート、マイクロウエルプレート、マルチプレート、マルチウエルプレート、セパレートストリップウエル、テラサキプレート、組織培養用チャンバースライド、シャーレ、細胞培養用シャーレ、組織培養用チューブ、トレイ、細胞培養用トレイ、セルフアクトリ、培養バッグ、テクノポット、ローラーボトル、スピナー、フォロファイバー等があげられる。培養器と細胞との接着性を制御するために、培養器の細胞と接触する側の表面を人工的に処理を施すこともできる。培養器の表面を人工的に処理する例としては、コラーゲンコート、ゼラチンコート、ポリ-L-リジンコート、フィブロネクチンコート、ラミニンコート、プロテオグリカンコート、グリコプロテインコート、マトリゲルコート、シリコンコート等があげられる。また、プライマリア（Falcon社製）などのように負の電荷を持つように処理することもできる。

#### 2. 培地の調製

本発明の、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する方法で用いる培地とは、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。

基礎培地としては、BME培地 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 89, 362 (1965))、BGJb培地 (Exp. Cell Res., 25, 41 (1961))、CMRL 1066 培地 (N.Y. Academy of Sciences, 5, 303 (1957))、Glasgow MEM培地 (Virology, 16, 147 (1962))、Improved MEM Zinc Option培地 (J. National Cancer Inst., 49, 1705 (1972))、IMDM培地 (In Vitro, 9, 6 (1970))、Medium 199 培地 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950))、Eagle MEM培地 (Science, 130, 432 (1959))、Alpha MEM培地 (Nature New Biology, 230, 310 (1971))、Dulbecco MEM培地 (Virology, 8, 396 (1959))、ハム培地 (Exp. Cell Res., 29, 515 (1963); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 288 (1965))、RPMI 1640 培地 (J. A. M. A., 199, 519 (1967))、Fischer's培地 (Methods in Med. Res., 10 (1964))、McCoy's培地 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 100, 115 (1959))、ウイリアムスE培地 (Exp. Cell Res., 69, 106 (1971); Exp. Cell Res., 89, 139 (1974))、およびこれらの混合培地など、動物細胞の培養に用いることのできる培地であればいずれも用いることができる。

また、マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル、Methods in Enzymology, volume 225, Guide to Techniques in Mouse Development, Academic Press (1993); ES細胞を用いた変異マウスの作製等に記載の胚培養のための培地、例えば、M2 培地、M16 培地、Whitten 培地、体外受精用培地など、胚の培養に用いることのできる培地であればいずれも基礎培地として用いることができる。

さらに、これら基礎培地に、血清代替物としての各種増殖因子を添加した培地、ストローマ細胞などが産生する因子を添加した培地、あるいは無蛋白培地であって、動物細胞や胚の培養が可能であるものであればいずれも本発明の培地として用いることができる。その具体的例として、市販のKNOCKOUT™ SRを添加した無血清培地 (M.D. Goldsboroughら、Focus, 20, 8 (1998))、インスリンおよびトランスフェリンを添加した無血清培地 (例えば、CHO-S-SFM II

(GIBCOBRL社製)、Hybridoma-SFM (GIBCOBRL社製)、eRDF Dry Powdered Media (GIBCOBRL社製)、UltraCULTURE™ (BioWhittaker社製)、UltraDOMA™ (BioWhittaker社製)、UltraCHO™ (BioWhittaker社製)、UltraMDCK™ (BioWhittaker社製)、ITPSG培地 (S. Hosoiら、Cytotechnology, 5, S17 (1991))、ITSFn培地 (A. Rizzino and C. Growley、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 457 (1980))、mN3培地 (S. Okabeら、Mech. Dev., 59, 89 (1996) など)、細胞由来の因子を添加した培地 (例えば、多能性奇形癌腫細胞PSA1の培養上清を添加した培地 (G.R. Martin、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7634 (1981))、後述の4に記載のストローマ細胞の培養上清を含む培地、後述の5に記載のストローマ細胞が産生する因子を含む培地、後述の8で得られた抗原成分を含む培地、BMP4を含む培地、または無蛋白培地 (例えば、CD-CHO (GIBCOBRL社製)、PFHM-II (GIBCOBRL社製)、UltraDOMA-PF™ (BioWhittaker社製) など) があげられる。

### 3. 胚性幹細胞の作製法

上記1.(2)で述べた(a)、(b)および(c)の胚性幹細胞の作製法を具体的に説明する。

#### (1) 着床以前の初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞の作製

着床以前の初期胚を、文献(マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル)に記載された方法に従って培養することで、該初期胚より胚性幹細胞を調製することができる。

#### (2) 体細胞の核を核移植した胚性幹細胞の作製

哺乳類動物細胞の体細胞の核を移植し正常な発生を開始した卵は、Wilmutら(Nature, 385, 810 (1997))、Cibelliら(Science, 280, 1256 (1998))、入谷明ら(蛋白質核酸酵素, 44, 892 (1999))、Baguisiら(Nature Biotechnology,

17, 456 (1999)), Wakayamaら (Nature, 394, 369 (1998); Nature Genetics, 22, 127 (1999); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14984 (1999)), Rideout IIIら (Nature Genetics, 24, 109 (2000)) 等によって報告された方法を用いて、例えば以下のように作製することができる。

哺乳類動物細胞の核を摘出後初期化（核を再び発生を繰り返すことができるような状態に戻す操作）し、除核した哺乳動物の未受精卵に注入する方法を用いて発生を開始させ、発生を開始した卵を培養することによって、他の体細胞の核を有し、かつ正常な発生を開始した卵が得られる。

体細胞の核を初期化する方法としては複数の方法が知られている。例えば、以下の方法が知られている。

核を提供する側の細胞を培養している培地を、5～30%、好ましくは 10%の仔ウシ胎児血清を含む培地（例えば、M2 培地）から 3～10 日、好ましくは 5 日間、0～1%、好ましくは 0.5%の仔ウシ胎児血清を含む貧栄養培地に変えて培養することで細胞周期を休止期状態（G0 期もしくはG1 期）に誘導することで初期化することができる。この方法は、哺乳動物が、例えばヒツジ、ヤギ、ウシなどの場合に好適である。

また、同種の哺乳動物の除核した未受精卵に、核を提供する側の細胞の核を注入し、数時間、好ましくは約 1～6 時間培養することで初期化することができる。この方法は、哺乳動物が、例えばマウスなどの場合に好適である。

初期化された核は除核された未受精卵中で発生を開始することが可能となる。初期化された核を除核された未受精卵中で発生を開始させる方法としては複数の方法が知られている。細胞周期を休止期状態（G0 期もしくはG1 期）に誘導し初期化した核を、電気融合法などによって同種の哺乳動物の除核した未受精卵に移植することで卵子を活性化し発生を開始させることができる。この方法は、哺乳動物が、例えばヒツジ、ヤギ、ウシなどの場合に好適である。

同種の哺乳動物の除核した未受精卵に核を注入することで初期化した核を、再度マイクロマニピュレーターを用いた方法などによって同種の哺乳動物の除核した未受精卵に移植し、卵子活性化物質（例えば、ストロンチウムなど）で刺激後、細胞分裂の阻害物質（例えば、サイトカラシンBなど）で処理し第二極体の放出を抑制することで発生を開始させることができる。この方法は、哺乳動物が、例えばマウスなどの場合に好適である。

いったん発生を開始した卵が得られれば、マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル；ジーン・ターゲッティング；ES細胞を用いた変異マウスの作製等に記載の公知の方法を用い、胚性幹細胞を取得することができる。

### (3) 染色体上の遺伝子を改変した胚性幹細胞の作製

相同組換え技術を用いることによって、染色体上の遺伝子を改変した胚性幹細胞を作製することができる。

例えば、改変する染色体上の遺伝子としては、組織適合性抗原の遺伝子、神経系細胞または表皮系細胞の障害に基づく疾患関連遺伝子などがあげられる。

染色体上の標的遺伝子の改変は、マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル；ジーン・ターゲッティング；ES細胞を用いた変異マウスの作製等に記載の方法を用い、行なうことができる。

具体的には、例えば、改変する標的遺伝子（例えば、組織適合性抗原の遺伝子や疾患関連遺伝子など）のゲノム遺伝子を単離し、単離したゲノム遺伝子を用いて標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。作製したターゲットベクターを胚性幹細胞に導入し、標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、染色体上の遺伝子を改変した胚性幹細胞を作製することができる。

標的遺伝子のゲノム遺伝子を単離する方法としては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、「モレキュラー・クローニング第2版」と略す) やCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、「カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー」と略す) 等に記載された公知の方法があげられる。また、ゲノムDNAライブラリスクリーニングシステム (Genome Systems社製) やUniversal GenomeWalker™ Kits (CLONTECH社製) などを用いることにより、標的遺伝子のゲノム遺伝子を単離することができる。

標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターは、ジーン・ターゲッティング; ES細胞を用いた変異マウスの作製等に記載の方法にしたがって作製することができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型、インサージョン型いずれでも用いることができる。

相同組換え体を効率的に選別する方法として、例えば、ジーン・ターゲッティング; ES細胞を用いた変異マウスの作製等に記載のポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、ポリA選択などの方法を用いることができる。

選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムDNAに対するサザンハイブリダイゼーション法 (モレキュラー・クローニング第2版) やPCR法 (PCR Protocols, Academic Press (1990)) 等があげられる。

#### 4. ストローマ細胞の調製

本発明において、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する方法に用いるストローマ細胞としては、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞への分化を誘導する活性を有していればいずれも用いることができる。7 に後述する方法で製造される本発明の抗体、好ましくは実施



例 15 (5) で得られるハイブリドーマ FERM BP-7573 が産生するモノクローナル抗体で認識されるストローマ細胞が好ましく用いられる。具体的には、

(a) 胎児初代培養繊維芽細胞 (マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル; ジーン・ターゲッティング; ES細胞を用いた変異マウスの作製)、

(b) SIHMマウス由来のSTO細胞 (G. Martin、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7634 (1981); M. J. Evansら、Nature, 292, 154 (1981)、

(c) マウス胎児由来のNIH/3T3 細胞 (J. L. Jainchillら、J. Virol., 4, 549 (1969))、

(d) M-CSF欠損マウス頭蓋冠由来のOP9 細胞 (T. Nakanoら、Science, 272, 722 (1996))、

(e) マウス頭蓋冠由来のMC3T3-G2/PA6 細胞 (H. Kodamaら、J. Cell. Physiol., 112, 89 (1982))、

(f) 既に多分化能を有していることが証明されている胚性幹細胞 (マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル) から分化誘導し得られるストローマ細胞、あるいは

(g) 各種ストローマ細胞への分化能を有していることが示されている骨髓間葉系幹細胞 (Science, 284, 143 (1999)) から分化誘導し得られるストローマ細胞をあげることができる。

上記の中でも、好ましくは上記 (c)、(d)、(e) のストローマ細胞であり、より好ましくは (e) のストローマ細胞である。

実施例 15 (5) で得られるハイブリドーマ FERM BP-7573 が産生するモノクローナル抗体で認識されるストローマ細胞は、文献 (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., 1995; 酵素免疫測定法, 第 3 版, 医学書院, 1987) 等に記載の免疫学的な測定法、例えば該抗体を用い

た酵素抗体法やフローサイトメーターを用いた細胞分離などの方法によって識別される。

ストローマ細胞の培養は、樹立された際に用いられた方法を用いて継代培養することが好ましい。また、マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル; Methods in Enzymology, volume 225, Guide to Techniques in Mouse Development, Academic Press (1993); ES細胞を用いた変異マウスの作製等に記載の胚性幹細胞の培養に用いるフィーダー細胞を培養するための方法を用いることもでき、例えば、Dulbecco MEM培地 (GIBCOBRL社製) に 10%のウシ胎児血清 (GIBCOBRL社製)、2mMグルタミン、50U/mlペニシリン、および 50U/mlストレプトマイシンを加えた培地を用いて培養することができる。

上述のストローマ細胞を、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する培養に用いる場合、培養皿等の適当な支持体上で増殖させたストローマ細胞を生きたまま用いても良いし、物理化学的处理を施すことにより増殖能力を失った細胞を用いても良い。物理化学的处理を施すことにより増殖能力を失った細胞とは、もはや遺伝子複製を伴う次世代子孫の形成能力が失われている細胞であり、具体的には、抗癌剤を含む培地を用いた培養、致死量の放射線照射、あるいは病理診断に用いられる組織固定のための処理を施すことにより得られた細胞である。

生きたままのストローマ細胞は、例えば、前日に培地交換を行ない細胞密度がほぼコンフルエント状態にまで達した細胞を、PBSで数回洗浄後、上記 2 で得られる本発明の培地 (例えば、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する培養に用いる無血清培地) を加えることで調製することができる。また、ほぼコンフルエントに達した細胞を適当な消化酵素 (例えば、0.02% EDTAを含み、0.05~0.25%のトリプシンあるいはアクチナーゼを含む PBS) で消化して回収し、上記 2 で得られる本発明の培地 (例えば、胚性幹細胞

胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する培養に用いる無血清培地)に懸濁後、培養器(例えば、0~1%、好ましくは0.1%ゼラチンでコートした組織培養皿)に播種し約1日間培養することによっても調製することができる。

抗癌剤を含む培地を用いた培養により、増殖能力を失ったストローマ細胞は、マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル; ジーン・ターゲッティング; ES細胞を用いた変異マウスの作製等に記載の方法を用い、調製することができる。例えば、前日に培地交換を行ない細胞密度がほぼコンフルエント状態にまで達した細胞を、1~100  $\mu$ g/ml、好ましくは10  $\mu$ g/mlの濃度のマイトマイシンCを含む培地で数時間、好ましくは2~3時間培養し、PBSで数回洗浄し、適当な消化酵素(例えば、0.02%EDTAを含み、0.05~0.25%のトリプシンあるいはアクチナーゼを含むPBS)で消化して回収し、上記2で得られる本発明の培地(例えば、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する培養に用いる無血清培地)に懸濁後、培養器(例えば、0~1%、好ましくは0.1%ゼラチンでコートした組織培養皿)に播種し約1日間培養することによって調製することができる。また、マイトマイシンCの代わりに他の抗癌剤、例えば5-フルオロウラシル、アドリアマイシン、アラCまたはメトトレキセートなどの抗癌剤を、生体に用いる日本薬局方記載の濃度の10分の1~10倍、好ましくは1倍の濃度で用いることでも、増殖能力を失ったストローマ細胞を調製することができる。

致死量の放射線照射によって増殖能力を失ったストローマ細胞は、組織培養の技術、朝倉書店(1982)、組織培養の技術(第二版)、朝倉書店(1988)、組織培養の技術(第三版)、朝倉書店(1996)等に記載の方法を用い、調製することができる。例えば、前日に培地交換を行ない細胞密度がほぼコンフルエント状態にまで達した細胞を、200~5,000ラド、好ましくは500~1,000ラドのX線あるいは $\gamma$ 線を照射し、PBSで数回洗浄後、後述の6で得られる本発明の培

地（例えば、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を分化誘導する培養に用いる無血清培地）を加えることで調製できる。また、放射線照射を施した細胞を適当な消化酵素（例えば、0.02%EDTAを含み、0.05～0.25%のトリプシンあるいはアクチナーゼを含むPBS）で消化して回収し、後述の6で得られる本発明の培地（例えば、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を分化誘導する培養に用いる無血清培地）に懸濁後、培養器（例えば、0～1%、好ましくは0.1%ゼラチンでコートした組織培養皿）に播種し約1日間培養することによっても調製できる。

病理診断に用いられる組織固定操作によって増殖能力を失ったストローマ細胞は、日本組織細胞化学会が編集し毎年発行している組織細胞化学、学際企画（1987-1999）、Basic Techniques for Transmission Electron Microscopy, Acad. Press (1986)、電子顕微鏡チャートマニュアル、医学出版センター（1993）等に記載の方法を用い、調製することができる。具体的には、マイクロウェーブ固定、急速凍結置換固定、グルタルアルデヒド固定、パラフォルムアルデヒド固定、ホルマリン固定、アセトン固定、ブアン固定、過ヨウ素酸固定、メタノール固定、またはオスミウム酸固定を行なうことによって調製できる。例えば、前日に培地交換を行ない細胞密度がほぼコンフルエント状態にまで達した細胞を、4℃で、0.1～50%、好ましくは1～10%、より好ましくは3～5%のパラフォルムアルデヒドを含む溶液中に、例えば数分間～数時間、好ましくは5分間～1時間、より好ましくは30分間浸潤し、PBSで数回洗浄することによって調製することができる。

##### 5. 胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞由来の因子を取得する方法

本発明におけるストローマ細胞より、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有する因子を取得することができる。具体的には、モレキュ

ラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Monoclonal Antibodies: principles and practice, Third Edition, Acad. Press (1993) (以下、「モノクローナル・アンチボデイズ」と略す)、Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1996) (以下、「アンチボディ・エンジニアリング」と略す)等に記載された発現クローニングの方法を用いて、行なうことができる。

具体的には、例えば、本発明におけるストローマ細胞よりcDNAを調製し、該cDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製し、cDNAライブラリーを作製する。該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、本発明におけるストローマ細胞が生産する遺伝子産物を産生する形質転換体を得、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有する遺伝子産物を産生する形質転換体を選択する。選択した該形質転換体に導入したcDNAにコードされている遺伝子配列を決定することにより、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有する因子を取得することができる。

以下に、詳細に説明する。

宿主細胞としては、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有していない細胞が好ましい。具体的には、チャイニーズハムスター卵巢由来のCHO細胞 (T. T. Puckら、J. Exp. Med., 108, 945 (1985))、コッカスパニエル雌犬腎臓由来のMDCK細胞 (C. R. Gaushら、Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 122, 931 (1966)); D. S. Misfeldtら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1212 (1976))、ラット繊維芽細胞 3Y1 (S. Sandineyerら、Cancer Res., 41, 830 (1981))、アフリカミドリザル腎臓由来のCOS細胞 (Y. Gluzman; Cell, 23, 175 (1981)) があげられる。これら宿主細胞の中でも、SV40系の発現ベクターを用いた発現クローニングに好適なCOS細胞がより好ましい。

cDNAの作製に用いる細胞としては、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞が好ましい。具体的には、胎児初代培養繊維芽細胞（マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアル；ES細胞を用いた変異マウスの作製）、SIHMマウス由来のSTO細胞（G. Martin、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7634 (1981)；M. J. Evansら、Nature, 292, 154 (1981))、より好ましくはマウス胎児由来のNIH/3T3細胞（J. L. Jainchillら、J. Virol., 4, 549 (1969))、M-CSF欠損マウス頭蓋冠由来のOP9細胞（T. Nakanoら、Science, 272, 722 (1996))、マウス頭蓋冠由来のMC3T3-G2/PA6細胞（H. Kodamaら、J. Cell. Physiol., 112, 89 (1982))をあげることができる。

cDNAライブラリーを調製する方法としては、後述の8に記載した方法があげられる。作製したcDNAライブラリーをそのまま用いてもよいが、目的とする遺伝子を濃縮するために、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有していない細胞のmRNAを用い、サブトラクション法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5783 (1988))を行なって作製したcDNAライブラリーを用いることもできる。

組換えベクターの導入方法、形質転換体を得る方法、および得られた形質転換体を培地に培養する方法としては、後述の8に記載した方法があげられる。

本発明の分化誘導法において、胚性幹細胞と形質転換体との共培養を行なうことで、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有する遺伝子産物を産生する形質転換体を選択することができる。

選択した形質転換体に導入したcDNAを単離する方法、および単離したcDNAの遺伝子配列を決定する方法としては、後述の8に記載した方法があげられる。

発現クローニングの手法以外にも、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞由来の因子を取得することができる。具体的には、本発明におけるストローマ細胞を出発原料とし、培地中に添加した

際の胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する促進効果を指標として精製することができる。精製方法としては、後述の 8 に記載した方法があげられる。

更に、ストローマ細胞由来の因子は、ムコ多糖（例えば、ヘパリン）に吸着する性質を有しているので、ストローマ細胞を培養した培養系中、あるいはストローマ細胞存在下で胚性幹細胞を非凝集状態で培養した培養系中の該因子をムコ多糖と結合させ、その後ムコ多糖に結合した前記ストローマ細胞由来の因子から該因子を取得することができる。例えば、ヘパリンを担体とするカラムクロマトグラフィーを用いてストローマ細胞由来の因子をヘパリンに結合させ、その後その結合した該因子を溶出させ、前記分化誘導促進効果を指標に該因子を取得することができる。

## 6. 分化誘導剤とそれを含む医薬

### (1) 分化誘導剤

本発明の分化誘導剤としては、上述のストローマ細胞あるいはストローマ細胞由来の因子を有効成分として含有するものであれば、いずれの態様でもよい。具体的には、胚性幹細胞とストローマ細胞を培養できる培地と上述のストローマ細胞を含むものがあげられる。また、上述のストローマ細胞の細胞断片や培養上清も分化誘導剤の有効成分としてあげられる。

ここで、上述のストローマ細胞の培養上清としては、胚性幹細胞を外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有する上述のストローマ細胞を培地中で培養して得られた培養上清、あるいは該ストローマ細胞をムコ多糖を含む培地中で培養して得られた培養上清をあげることができる。

ここで、ムコ多糖としては、様々なストローマ細胞が産生する、胚性幹細胞を外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有する因子に結合する能力を有しているものであればいかなるものでも用いることができるが、

例えばペパリンなどが好ましい。ヘパリンとしては市販されている公知のヘパリンを用いることができる。上記培養上清は、ヘパリンを数ng/ml～数千ng/ml、好ましくは数百ng/mlの範囲で含む培地を用い、上述のストローマ細胞を5分から数日間培養することで調製することができる。このようにして得られた培養上清は、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する分化誘導剤や、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性因子取得の際に有効に用いることができる。

また、ムコ多糖、例えばペパリンは、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性因子に特異的に相互作用する性質を有していると考えられるので、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程における調節に関連する物質の評価方法やスクリーニング方法、あるいは外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能の調節に関連する物質の評価方法やスクリーニング方法に有効に用いることができる。

外胚葉細胞から表皮系細胞への分化誘導剤としては、BMP4を含むことが好ましい。

## (2) 分化誘導剤を含む医薬

本発明の分化誘導剤は、外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の治療薬として用いることができる。

外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患としては、神経系細胞の障害に基づく疾患あるいは表皮系細胞の障害に基づく疾患があげられる。

神経系細胞の障害に基づく疾患としては、アルツハイマー病、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、虚血性脳疾患、てんかん、脳外傷、背堆損傷、運動神経疾患、神経変性疾患、網膜色素変性症、内耳性難聴、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、神経毒物の障害に起因する疾患などが、表皮系細胞の障害に基づく疾患としては、火傷、外傷、創傷治癒、床擦れ、乾せんなどがあげられる。



本発明の分化誘導剤を有効成分として含有する医薬は、該有効成分を単独で投与することも可能ではあるが、通常は該有効成分を薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。好ましくは水、あるいは食塩、グリシン、グルコース、ヒトアルブミン等の水溶液等の水性担体に溶解した無菌的な溶液が用いられる。また、製剤溶液を生理的条件に近づけるための緩衝化剤や等張化剤のような、薬理学的に許容される添加剤、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸ナトリウム等を添加することもできる。また、凍結乾燥して貯蔵し、使用時に適当な溶媒に溶解させて用いることもできる。

投与経路は、治療に際し最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、あるいは口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができる。投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。例えば乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。例えば、注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。また、噴霧剤は該有効成分そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該有効成分を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該有効成分および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重等により異なるが、通常成人1日当たり  $10 \mu\text{g/kg}$  ~  $8\text{mg/kg}$  である。

#### 7. ストローマ細胞を認識する抗体の取得方法

本発明におけるストローマ細胞を免疫原として用いることにより、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等、本発明のストローマ細胞を認識する抗体を作製することができる。細胞を免疫原として用い、免疫原として用いた細胞の細胞表面特異的な抗体およびその抗体が認識する抗原分子を取得した報告はこれまでに数多くなされており (N. Itohら、Cell, 66, 233 (1991))、多くの細胞表面抗原分子が同定されCD抗原として知られている。

現在では、蛋白質やペプチドを免疫原として抗体を作製する場合と同様、細胞を免疫原として細胞表面分子を認識する抗体を作製する手法が確立されており、例えば以下の方法により本発明におけるストローマ細胞を認識する抗体を調製することができる。

### (1) ポリクローナル抗体の作製

本発明に用いるストローマ細胞を免疫原として用い、動物に投与することによりポリクローナル抗体を作製することができる。

投与する動物として、ウサギ、ヤギ、3～20 週令のラット、マウス、ハムスター等を用いることができる。

該免疫原の投与量は動物 1 匹当たり  $10^4 \sim 10^8$  個の細胞あるいは該細胞から調製した細胞膜成分 0.01～10mgが好ましい。

該免疫原は、適当なアジュバンド（例えば、フロイン드의完全アジュバンド (Complete Freund's Adjuvant) または、水酸化アルミニウムゲル、百日咳菌ワクチンなど）とともに皮下、または腹腔内に投与する。

該免疫原の投与は、1 回目の投与の後 1～2 週間おきに 3～10 回行う。各投与後、3～7 日目に眼底静脈叢より採血し、該血清が免疫に用いた免疫原と反応することを酵素免疫測定法（酵素免疫測定法 (ELISA法)：医学書院刊（1976 年）、Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)（以下、「アンチボディズ・ア・ラボラトリー・マニュアル」と略す）、あるいはフローサイトメーターを用いた方法（モノクローナル・アンチボディズ）等で確認する。

免疫原に用いた細胞の細胞膜成分は、既に多くの公知の方法を用いて調製できることが知られており、例えば、ショ糖濃度の違いによる密度差を利用した Jonesらの方法 (D. H. Jones and A. L. Matus, Biochim. Biophys. Acta., 356, 276 (1974)) を用いて調製することができ、この細胞膜成分をコートしたプレートを用いて酵素免疫測定を行なうことができる。

免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した非ヒト哺乳動物より血清を取得し、該血清を分離、精製することによりポリクローナル抗体を取得することができる。

分離、精製する方法としては、遠心分離、40～50%飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿（アンチボディズ・ア・ラボラトリー・マニュアル）、またはDEAE-セファロースカラム、陰イオン交換カラム、プロテインAまたはG-カラムあるいはゲル濾過カラム等を用いるクロマトグラフィー等を、単独または組み合わせて処理する方法があげられる。

## (2) モノクローナル抗体の作製

### (a) 抗体産生細胞の調製

免疫に用いた本発明におけるストローマ細胞に対し、その血清が十分な抗体価を示したマウスまたはラットを抗体産生細胞の供給源として供する。

該抗体価を示したマウスまたはラットに免疫原として用いた細胞を最終投与した後 3～7 日目に、脾臓を摘出する。

該脾臓をMEM培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、1,200rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈殿画分の脾細胞をトリス-塩化アンモニウム緩衝液（pH7.65）で1～2分間処理し赤血球を除去した後、MEM培地で3回洗浄し、得られた脾細胞を抗体産生細胞として用いる。

### (b) 骨髄腫細胞の調製

骨髄腫細胞としては、マウスまたはラットから取得した株化細胞を使用する。例えば、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髄腫細胞株P3-X63Ag8-U1（以下、「P3-U1」と略す）（Curr. Topics. Microbiol. Immunol., 81, 1 (1978)), Europ. J. Immunol., 6, 511 (1976)), SP2/0-Ag14 (SP-2) (Nature, 276, 269 (1978)), P3-X63-Ag8653(653) (J. Immunol., 123, 1548 (1979)), P3-X63-Ag8(X63) (Nature, 256, 495 (1975)) 等を用いることができる。これらの細胞株は、8-アザグアニン培地（RPMI-1640 培地にグルタミン（1.5mM）、

2-メルカプトエタノール ( $5 \times 10^{-6} \text{M}$ )、ジェンタマイシン ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) および牛胎児血清 (FCS) (CSL社製、10%) を加えた培地 (以下、「正常培地」という) に、さらに 8-アザグアニン ( $15 \mu\text{g/ml}$ ) を加えた培地) で継代するが、細胞融合の 3~4 日前に正常培地で培養し、融合には該細胞を  $2 \times 10^7$  個以上用いる。

(c) ハイブリドーマの作製

(a) で取得した抗体産生細胞と (b) で取得した骨髓腫細胞を MEM 培地または PBS (リン酸二ナトリウム 1.83g、リン酸一カリウム 0.21g、食塩 7.65g、蒸留水 1 リットル、pH7.2) でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞 : 骨髓腫細胞 = 5~10 : 1 になるよう混合し、1,200rpm で 5 分間遠心分離した後、上清を捨てる。

得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐし、該細胞群に、攪拌しながら、37°C で、 $10^8$  抗体産生細胞あたり、ポリエチレングライコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM 2ml およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.7ml を混合した溶液を 0.2~1ml 添加し、さらに 1~2 分間毎に MEM 培地 1~2ml を数回添加する。

添加後、MEM 培地を加えて全量が 50ml になるように調製する。該調製液を 900rpm で 5 分間遠心分離後、上清を捨てる。得られた沈澱画分の細胞を、ゆるやかにほぐした後、メスピペットによる吸込み、吹出しでゆるやかに HAT 培地 (正常培地に ヒポキサンチン ( $10^{-4} \text{M}$ )、チミジン ( $1.5 \times 10^{-5} \text{M}$ ) および アミノプテリン ( $4 \times 10^{-7} \text{M}$ ) を加えた培地) 100ml 中に懸濁する。

該懸濁液を 96 穴培養用プレートに  $100 \mu\text{l}$ /穴ずつ分注し、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター中、37°C で 7~14 日間培養する。

培養後、培養上清の一部をとり アンチボディズ・ア・ラボラトリー・マニュアル等に述べられている 酵素免疫測定法、または モノクローナル・アンチボディズ等に述べられている フローサイトメーターを用いた方法により、本発明における ストローマ細胞に特異的に反応する ハイブリドーマを選択する。

酵素免疫測定法の具体的例として、以下の方法をあげることができる。

免疫の際、免疫原に用いた本発明におけるストローマ細胞から調製した細胞膜画分を適当なプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは後述の (d) で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗ラットまたは抗マウスイムノグロブリン抗体を反応させた後に標識物質に応じた反応を行ない、本発明におけるストローマ細胞に特異的に反応するものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

フローサイトメーターを用いた方法の具体例として、以下の方法をあげることができる。

免疫原に用いた細胞をハイブリドーマ上清もしくは後述の (d) で得られる精製抗体を第一抗体として反応させ、さらに第二抗体としてビオチンあるいは蛍光物質等で標識した抗マウスまたは抗ラットイムノグロブリン抗体を反応させ、ビオチン標識した第二抗体を用いた場合には、さらに蛍光標識したアビジンと反応させた後にFACS等のフローサイトメーターを用いて染色の有無を確認し、本発明におけるストローマ細胞に特異的に反応するものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

該ハイブリドーマを用いて、限界希釈法によりクローニングを 2 回繰り返し (1 回目は、HT培地 (HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2 回目は、正常培地を使用する)、安定して強い抗体価の認められたものを本発明のモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株として選択する。

#### (d) モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理 (2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristane) 0.5mlを腹腔内投与し、2 週間飼育する) した 8~10 週令のマウスまたはヌードマウスに、(c) で取得した本発明のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細

胞  $5 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$  細胞/匹を腹腔内に注射する。10～21 日間でハイブリドーマは腹水癌化する。

該腹水癌化したマウスから腹水を採取し、3,000rpmで 5 分間遠心分離して固形分を除去する。

得られた上清より、ポリクローナルで用いた方法と同様の方法でモノクローナル抗体を精製、取得することができる。

抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットを用いて行う。蛋白質量は、ローリー法あるいは 280nmでの吸光度より算出する。

上記の方法で得られるモノクローナル抗体として、例えば実施例 15 (5) で得られるハイブリドーマ FERM BP-7573 が産生するモノクローナル抗体があげられる。

#### 8. 本発明の抗体が認識する抗原の取得

上記 4 で取得した本発明に用いたストローマ細胞を免疫原として得られた抗体は、多くの細胞表面に存在する抗原分子を認識する。そこで、得られた抗体を用いて、該抗体が認識する抗原分子を取得することができる。具体的には、モレキュラー・クローニング第 2 版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、モノクローナル・アンチボディズ、アンチボディ・エンジニアリング等に記載された発現クローニングの方法を用いて、行なうことができる。

具体的には、例えば、本発明におけるストローマ細胞よりcDNAを調製し、該cDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製しcDNAライブラリーを作製する。該組換えベクターを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、本発明におけるストローマ細胞が生産する遺伝子産物を産生する形質転換体を得、本発明の抗体と反

応する遺伝子産物を産生する形質転換体を選択する。選択した該形質転換体に導入したcDNAにコードされている遺伝子配列を決定することにより、本発明の抗体が認識する抗原分子を取得することができる。

以下に、詳細に説明する。

宿主細胞としては、ファージ、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中への組込が可能で、本発明の抗原分子をコードするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

第1に本発明におけるストローマ細胞から全RNAを調製する。その方法としては、チオシアン酸グアニジン-トリフルオロ酢酸セシウム法 (Methods in Enzymology, 154, 3 (1987))、酸性チオシアン酸グアニジン・フェノール・クロロホルム (AGPC) 法 (Analytical Biochemistry, 162, 156 (1987)、実験医学、9 (1937 (1991))) などがあげられる。また、全RNAからpoly(A)<sup>+</sup> RNAとしてmRNAを調製する方法としては、オリゴ (dT) 固定化セルロースカラム法 (モレキュラー・クローニング第2版) 等があげられる。さらに、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen社製)、Quick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社製) などのキットを用いることによりmRNAを調製することができる。

調製したストローマ細胞mRNAからcDNAライブラリーを作製する方法としては、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えば SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies社製)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE社製) を用いる方法などがあげられる。



cDNAライブラリーを作製するためのベクターとしては、大腸菌K12 株等の微生物中で自立複製でき、かつ宿主細胞において導入したcDNAを発現できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる。

ファージを宿主細胞として用いる場合には、例えば、市販のキット Recombinant Phage Antibody System (Pharmacia社製) を用いることで、調製したcDNAを導入した形質転換体を得ることができる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、調製したcDNAを含有してなる組換えベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、cDNA遺伝子、転写終結配列、より構成されたベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベーリンガーマンハイム社製)、pKK233-2 (Pharmacia社製)、pSE280、pSE380、pSE420 (Invitrogen社製)、pAX、pMEX (MOBITEC社製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社製)、pKYP10 (特開昭 58-110600)、pKYP200 (Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984))、pLSA1 (Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989))、pGEL1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985))、pBluescript II SK(-) (Stratagene社製)、pTrs30 (Escherichia coli JM109/pTrS30 (FERM BP-5407) より調製)、pTrs32 (Escherichia coli JM109/pTrS32 (FERM BP-5408) より調製)、pGHA2 (Escherichia coli IGHA2 (FERM B-400) より調製、特開昭 60-221091)、pGKA2 (Escherichia coli IGKA2 (FERM BP-6798) より調製、特開昭 60-221091)、pTerm2 (US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 (J. Bacteriol., 172, 2392 (1990))、pGEX (Amersham Pharmacia Biotech社製)、pETシステム (Novagen社製) 等をあげることができる。

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター ( $P_{trp}$ )、lacプロモーター、 $P_L$ プロモーター、 $P_R$ プロモーター、T7 プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターをあげることができる。また $P_{trp}$ を 2 つ直列させたプロモーター ( $P_{trp} \times 2$ )、tacプロモーター、lacT7 プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列であるシャイン-ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば 6~18 塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Pseudomonas sp. D-0110 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972))、プロトプラスト法 (特開

昭 63-248394)、または Gene, 17, 107 (1982) や Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979) に記載の方法等をあげることができる。

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419) 等をあげることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、PH05 プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MF $\alpha$ 1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、サッカロミセス属、クリュイベロミセス属、トリコスボロン属、シュワニオミセス属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 (Methods. Enzymol., 194, 182 (1990))、スフェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 (1929 (1978))、酢酸リチウム法 (J. Bacteriology, 153, 163 (1983))、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978) 記載の方法等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pcDNAI、pCDM8 (フナコシ社製)、pAGE107 (特開平 3-22979 ; Cytotechnology, 3, 133, (1990))、pAS3-3 (特開平 2-227075)、pCDM8 (Nature, 329, 840, (1987))、EBV Vector (Invitrogen 社製)、pRc/CMV2 (Invitrogen 社製)、pRc/RSV (Invitrogen 社製)、pZeoSV Vector (Invitrogen 社製)、pcDNAI/Amp (Invitrogen 社製)、pDisplayp (Invitrogen 社製)、REP4 (Invitrogen 社製)、

pcDNA3.1 Vector (Invitrogen 社 製)、pXT1 (Invitrogen 社 製)、pSG5 (Invitrogen社製)、pBK-CMV (Stratagene社製)、pBK-RSV (Stratagene社製)、pAGE103 (J. Biochemistry, 101, 1307 (1987))、pAGE210 等をあげることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40 の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭 63-299) 等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 (Cytotechnology, 3, 133 (1990))、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)) 等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York (1992)、Bio/Technology, 6, 47 (1988) 等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質を発現させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII（ともにInvitrogen社製）等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 (Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York (1992))、Trichoplusianiの卵巣細胞であるHigh 5 (Invitrogen社製) 等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、リポフェクション法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)) 等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35Sプロモーター、イネアクチン1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 法 (特開昭 59-140885、特開昭 60-70080、W094/00977)、エレクトロポレーション

ョン法（特開昭 60-251887）、パーティクルガン（遺伝子銃）を用いる方法（日本特許第 2606856 号、日本特許第 2517813 号）等をあげることができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養することにより、導入した cDNA がコードする遺伝子産物を発現させることができる。形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は 15～40℃ がよく、培養時間は、通常 16 時間～7 日間である。培養中の pH は 3.0～9.0 に保持する。pH の調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI1640 培地 (The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967))、Eagle の MEM 培地 (Science, 122, 501 (1952))、ダルベッコ改変 MEM 培地 (Virology, 8, 396 (1959))、199 培地 (Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1 (1950)) またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常 pH6~8、30~40℃、5%CO<sub>2</sub> 存在下等の条件下で 1~7 日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている TNM-FH 培地 (Pharmingen 社製)、Sf-900 II SFM 培地 (Life Technologies 社製)、ExCell400、ExCell405 (いずれも JRH Biosciences 社製)、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)) 等を用いることができる。

培養は、通常 pH6~7、25~30℃等の条件下で、1~5 日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ (MS) 培地、ホワイト (White) 培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH5~9、20~40℃の条件下で3~60日間行う。

また、培養中に必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、本発明におけるストローマ細胞から調製したcDNAを組み込んだ組換え体ベクターを保有する微生物、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養することにより、該cDNAがコードしている遺伝子産物を発現する形質転換体を得ることができる。

本発明の抗体と反応する遺伝子産物を産生する形質転換体を選択する方法としては、アンチボディズ・ア・ラボラトリー・マニュアル、モノクローナル・アンチボディズ、アンチボディ・エンジニアリング、酵素免疫測定法、第3版、医学書院(1987)等に述べられている酵素免疫測定法、アンチボディズ・ア・ラボラトリー・マニュアル、モノクローナル・アンチボディズ、アンチボディ・エンジニアリング、Int. Immunol., 10, 275 (1998)、Exp. Hematol., 25, 972 (1997)等に述べられているフローサイトメーターを用いた方法、またはモノクローナル・アンチボディズ、アンチボディ・エンジニアリング、J. Immunol., 141, 2797 (1988)等に述べられているパニング法をあげることができる。

選択した形質転換体に導入したcDNAを単離する方法としては、宿主細胞において自立複製可能な発現ベクターを用いた場合には、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Mol. Cell. Biol., 8, 2837 (1988)等に記載の通常のパージベクター、プ



ラスミドベクターを回収する方法、あるいはHirt法をあげることができる。染色体中への組込れる発現ベクターの場合には、宿主細胞に導入するcDNAを複数種類（例えば、100～1000 種）からなる集団にプール分けし、目的とする形質転換体を与える集団を更に少ない種類（例えば、10～100 種）のcDNAからなる集団にプール分けすることを繰り返すことで、目的とするcDNAを単離することができる。

単離したcDNAの塩基配列を末端から、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばサンガー（Sanger）らのジデオキシ法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463（1977））あるいはABI PRISM377DNAシーケンサー（PE Biosystems社製）等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該DNAの塩基配列を決定することができる。

以上のように、発現クローニングの方法を用いて、本発明の抗体が認識する抗原分子を取得することができる。

本発明では、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有していない細胞（例えば、後述する実施例 3 において開示されている）を利用して発現クローニングを行なうことが好適である。

具体的には、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞へ分化誘導する活性を有していない細胞を宿主細胞とし、本発明におけるストローマ細胞から調製したcDNAを導入して発現させ、本発明におけるストローマ細胞を認識する抗体を用いて選択する発現クローニングの手法があげられる。

胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有していない細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣由来のCHO細胞（T. T. Puckら、J. Exp. Med., 108, 945（1985））、アフリカミドリザル腎臓由来のCOS細胞（Y. Gluzman、Cell, 23, 175（1981））、コッカスパニエル雌犬腎臓由来のMDCK細胞（C. R. Gaushら、Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 122, 931（1966）；D. S. Misfeldtら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1212（1976））、ラット繊維芽

細胞 3Y1 (S. Sandineyerら、Cancer Res., 41, 830 (1981)) があげられる。したがって、宿主細胞として、CHO細胞、MDCK細胞、3Y1 細胞、より好ましくはSV40 系の発現ベクターを用いた発現クローニングに好適なCOS細胞を用いることが望ましい。

発現クローニングの手法以外にも、本発明のストローマ細胞を認識する抗体を用いて、該抗体が認識する抗原分子を取得することができる。具体的には、本発明におけるストローマ細胞を出発原料とし、該抗体との反応性を上述の酵素免疫測定法を用いて測定することを指標として精製することができる。

具体的には、本発明におけるストローマ細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル、界面活性剤処理等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE)-セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化学社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、抗原精製標品を得ることができる。

## 9. 本発明の分化誘導法、細胞、抗体、抗原および分化誘導剤の利用

### (1) 本発明の分化誘導方法を利用した物質の評価またはスクリーニング方法

本発明の、胚性幹細胞を外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞へ分化誘導する培養方法は、これら細胞の分化過程あるいは細胞の機能調節における生理活性

物質（例えば、薬物）や機能未知の新規遺伝子産物などの薬理評価および活性評価に有用である。また、特定の遺伝子を改変した胚性幹細胞を用いることにより、胚性幹細胞が外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞へ分化していく過程における、該遺伝子の機能評価にも有用である。

本発明の培養法の利用方法としては、例えば、以下のものがあげられる。

本発明の分化誘導方法を用いることにより、培地中に添加した被検物質の外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞への分化の過程、または外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞の機能調節に及ぼす影響を評価することができる。被検物質としては、培養系に加えることができるものであればどのようなものでもよく、例えば、低分子化合物、高分子化合物、有機化合物、無機化合物、蛋白質、遺伝子、ウイルス、細胞などがあげられる。遺伝子を除く被検物質は、培養培地中に直接添加すればよい。

遺伝子を効率的に培養系に導入する方法としては、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス等のウイルスベクターに乗せて培養系に添加する方法、またはリポソームなどの人工的なベジクル構造に封入して培養系に添加する方法などがあげられる。その具体的例としては、組換えウイルスベクターを用いた遺伝子解析に関する報告 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733 (1995); Nucleic Acids Res., 18, 3587 (1990); Nucleic Acids Res., 23, 3816 (1995)) をあげることができる。

これらの被検物質は、上記分化誘導法における培養系にどのような時期でも添加することができ、例えば、幹細胞が外胚葉細胞へ分化する過程に対する作用を評価したい場合には比較的培養の初期に、外胚葉細胞から外胚葉由来の細胞に分化する過程に対する作用を評価したい場合には比較的培養の後期に被検物質を添加することで評価することができる。培養系において分化の程度を判断するには、胚性幹細胞から分化の結果生じる各種分化細胞のマーカー蛋白質の発現を調べることで把握することができる。被検物質の評価あるいはスクリ

ーニングは、所定時間の培養後、例えば、外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞への分化効率の質的または量的な変化を測定することで行なうことができる。質的な変化の測定方法としては、具体的には、van Inzenらが胚性幹細胞から分化誘導した神経細胞を用いて活動電位を測定した例があげられる (Biochim. Biophys. Acta., 1312, 21 (1996))。

## (2) 細胞を含有する医薬

本発明で用いるストローマ細胞あるいは本発明のストローマ細胞由来の因子、またはそれらにより胚性幹細胞を分化誘導して得られた外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞は、外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の治療、診断あるいは予防のための医薬として用いることができる。

外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患としては、前述の 6. (2) に記載された各種疾患があげられる。

外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の治療薬としては、移植医療に利用可能な、障害を受けた細胞の機能と同じ機能を有する細胞、障害を受けた細胞の前駆細胞、障害を受けた細胞の機能を代償する細胞、障害を受けた細胞の再生を促進する機能を有する細胞が用いられる。

本発明の治療薬は、本発明の、胚性幹細胞より分化誘導した外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を調製し、これを有効成分とすることにより製造できる。また、上記 4 の方法でストローマ細胞を、前述 5 の方法でストローマ細胞由来の因子を調製し、これを有効成分とすることにより製造することができる。本発明の治療薬は、外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患において、障害を受けた細胞の再生を促進させる機能を有する。

細胞の純度を高める方法は、公知となっている細胞分離精製の方法であればいずれも用いることができるが、その具体的例として、アンチボディズ・ア・ラボラトリー・マニュアル、モノクローナル・アンチボディズ、アンチボディ・

エンジニアリング、Int. Immunol., 10, 275 (1998)、Exp. Hematol., 25, 972 (1997) 等に述べられているフローサイトメーターを用いた方法、モノクローナル・アンチボディズ、アンチボディ・エンジニアリング、J. Immunol., 141, 2797 (1988) 等に述べられているパニング法、組織培養の技術 (第三版), 朝倉書店 (1996) 等に記載のショ糖濃度の密度差を利用した細胞分画法をあげることができる。

本発明の分化細胞の純度を高める方法は、上述のような胚性幹細胞を分化誘導して得られた外胚葉細胞あるいは外胚葉由来の細胞を、抗癌剤を含む培地中で培養する工程を含む。これにより、未分化な状態の細胞を除去することができ、より純度の高い分化細胞を得ることが可能で、医薬としてより好適となる。即ち、抗癌剤で処理することにより、目的とする分化細胞以外の細胞、例えば未分化な細胞を除去することができる。このような未分化細胞は奇形腫瘍テラトーマの原因になることが危惧されるが、抗癌剤で処理することでその危険性を回避できる。

ここで、抗癌剤としては、マイトマイシンC、5-フルオロウラシル、アドリアマイシン、アラCまたはメトトレキサートなどがあげられる。これら抗癌剤は、分化誘導した細胞よりも未分化な状態の細胞に、より細胞毒性を示す濃度で用いることが好ましい。具体的には、上述の 4 に記載した方法にしたがい、これら抗癌剤を用いた培養を行い、至適濃度を決定することができ、例えば、これら抗癌剤を生体に用いる日本薬局方記載の濃度の 100 分の 1~1 倍の濃度で含む培地を用い、5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub> インキュベーターで、37℃で数時間、好ましくは2時間培養する方法をあげることができる。

ここで使用する培地としては、分化誘導した細胞を培養することが可能な培地であればいかなるものも用いることができる。具体的には、上述の 2 に記載の培地等をあげることができる。また、これら抗癌剤は、分化誘導した細胞に上述の 4 に記載した方法にしたがって使用することができる。

本発明の治療薬は、上記の細胞（外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞、ストローマ細胞を含む）に、薬理学的に許容される生理食塩水、添加剤および／または培地を含んでも構わないが、移植医療の目的に用いられるため、血清やウイルス等の不純物の混入が無いことが好ましい。上記因子を含む治療薬は、後述する 9. (4) の方法により製造するが、細胞の治療薬と同様に血清やウイルス等の不純物の混入がないことが好ましい。本発明の方法によれば、無血清培養条件下で、また、非生理的な濃度のレチノイン酸等の分化誘導剤を用いる必要もなく、外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導することができ、移植医療に有用である。

移植医療においては、組織適合性抗原の違いによる拒絶がしばしば問題となるが、前述の 1. (2) に記載の体細胞の核を核移植した胚性幹細胞あるいは前述の 1. (3) に記載の染色体上の遺伝子を改変した胚性幹細胞を用いることで克服できる。

また、前述の 1. (2) に記載の体細胞の核を核移植した胚性幹細胞を用いて分化誘導することで、体細胞を提供した個人の外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を得ることができる。このような個人の細胞は、その細胞自身が移植医療として有効のみならず、既存の薬物がその個人に有効か否かを判断する診断材料としても有用である。さらに、分化誘導した細胞を長期に培養することで酸化ストレスや老化に対する感受性の判定が可能であり、他の個体由来の細胞と機能や寿命を比較することで神経変性疾患等の疾患に対する個人のリスクを評価することができ、それら評価データは将来の発病率が高いと診断される疾患の効果的な予防法を提供するために有用である。

移植の方法としては、対象となる疾患に適した方法であればいずれの方法も用いることができ、疾患ごとにそれぞれの疾患に適した公知の方法が知られている。例えば、疾患患者より胚性幹細胞を取得し、ストローマ細胞およびストローマ細胞由来の因子を加えて、得られた胚性幹細胞を培養する。該胚性幹細胞

胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を分化誘導させたのちに、患者の疾患部位に移植することにより疾患を治療することができる。または、ストローマ細胞およびストローマ細胞由来の因子を疾患患者の疾患部位に直接投与しても疾患を治療することができる。具体的に、パーキンソン病患者に対する中絶胎児の脳細胞を移植する方法としては、Nature Neuroscience, 2, 1137 (1999)等に記載の方法があげられる。

(3) 抗体を用いて抗原を免疫学的に検出する方法、および抗体を含有する医薬

本発明の、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞を特異的に認識する抗体を用い、抗原抗体反応を行わせることにより、本発明の抗原または該抗原を含む組織を免疫学的に検出することができる。該検出法および該抗体を含む医薬は、外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患など、該ストローマ細胞の機能の低下あるいは消失に起因する疾患の診断に利用することができる。また、該検出方法は、抗原の定量にも用いられる。

外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患としては、前述の 6. (2) に記載の各種疾患があげられる。

免疫学的に検出する方法としては、マイクロタイタープレートを用いる ELISA 法、蛍光抗体法、ウェスタンブロット法、免疫組織染色法等があげられる。免疫学的に定量する方法としては、液相中で本発明の抗原と反応する抗体のうちエピトープが異なる 2 種類の抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法、 $^{125}\text{I}$ 等の放射性同位体で標識した本発明の抗原と本発明の抗原を認識する抗体とを用いるラジオイムノアッセイ法等があげられる。

#### (4) 抗原を含有する医薬

本発明の抗体が認識する、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞で特異的に発現している抗原分子は、外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の治療薬として用いることができる。

外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患としては、前述の 6. (2) に記載の各種疾患があげられる。

本発明の抗原を有効成分として含有する医薬を有効成分として含有する医薬は、該有効成分を単独で投与することも可能ではあるが、通常は該有効成分を薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。これらの医薬製剤の形態、投与経路、投与量、使用形態等は、前述の 6. (2) に記載の医薬製剤の形態、投与経路、投与量、使用形態等があげられる。

#### 図面の簡単な説明

第 1 図は、ES細胞EB5 とPA6 細胞との共培養の結果出現したコロニーを、(A) NCAM、(B) チューブリン、(C) ネスチンに対する抗体で染色した結果を示した顕微鏡写真である。

第 2 図は、ES細胞EB5 とMEF細胞との共培養の結果出現したコロニーを抗NCAM抗体で染色した結果を示した顕微鏡写真である。

第 3 図は、ES細胞EB5 とPA6 細胞との共培養の結果出現したコロニーをチロシン水酸化酵素に対する抗体で染色した結果を示した顕微鏡写真である。

第 4 図は、ES細胞EB5 とPA6 細胞との共培養の結果出現したコロニーの中で各種マーカー陽性のコロニーの割合を経時的に示したグラフである。



第 5 図は、BMP4 無添加でES細胞EB5 とPA6 細胞との共培養の結果出現したコロニーの中で、(A) NCAMに対する抗体、(B) ネスチンに対する抗体、(C) Eカドヘリンに対する抗体および (G) ケラチン 14 に対する抗体を用いて染色した結果、およびBMP4 添加でES細胞とPA6 細胞との共培養の結果出現したコロニーの中で、(D) NCAMに対する抗体、(E) ネスチンに対する抗体、(F) Eカドヘリンに対する抗体および (H、I) ケラチン 14 に対する抗体を用いて染色した結果を示した顕微鏡写真である。

第 6 図は、PA6 細胞とES細胞EB5 を、フィルターを介して共培養した場合 (フィルター)、フィルターを介さないで共培養した場合 (PA6)、およびPA6 細胞なしにES細胞EB5 をゼラチン上で培養した場合 (ゼラチン) とで、出現したコロニーをチューブリンに対する抗体を用いて染色した結果を示したグラフである。

第 7 図は、ES細胞EB5 とPA6 細胞との共培養の結果出現した分化細胞中のNurr1、Ptx3 およびG3PDHの発現量をRT-PCR法にて解析した結果を示した図である。胎生 12 日のマウス頭部の細胞 (図中、Embryoと表記)、PA6 細胞と 12 日間共培養したES細胞EB5 (図中、ES+PA6 と表記) および対照として 12 日間培養したES細胞EB5 (図中、ESと表記) を材料として、RT-PCRを行いアガロース電気泳動にて解析した結果を示した。

第 8 図は、ES細胞EB5 とPA6 細胞との共培養の結果出現した分化細胞を脱分化刺激することで、培地中に分泌された成分をHPLC法にて解析した結果を示したクロマトグラフである。対照として、フィーダー細胞として用いたPA6 細胞のみに対して同様の脱分化刺激を与えた際に分泌された成分の解析を行った結果を右上のクロマトグラフに示した。

第 9 図は、モノクローナル抗体KM1306 とPA6 細胞との反応性を、セルソーターを用い蛍光抗体法により解析した結果を示すものである。対照として、抗体

の種およびサブクラスが一致したラットIgMモノクローナル抗体KM2070 を用いて同様の解析を行った結果を示した。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

第 10 図は、モノクローナル抗体 KM1307 と PA6 細胞との反応性を、セルソーターを用い蛍光抗体法により解析した結果を示すものである。対照として、抗体の種およびサブクラスが一致したラット IgM モノクローナル抗体 KM2070 を用いて同様の解析を行った結果を示した。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

第 11 図は、モノクローナル抗体 KM1310 と PA6 細胞との反応性を、セルソーターを用い蛍光抗体法により解析した結果を示すものである。対照として、抗体の種およびサブクラスが一致したラット IgM モノクローナル抗体 KM2070 を用いて同様の解析を行った結果を示した。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示を示すものにすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。

##### 実施例 1

胚性幹細胞のドーパミン作動性神経細胞への分化：

胚性幹細胞である ES 細胞 EB5 (H. Niwa ら、Nature Genet., 24, 372, (2000); 大阪大学医学部分子制御医学講座 丹羽仁史博士より恵与された) とストローマ細胞である MC3T3-G2/PA6 細胞 (H. Kodama ら、J. Cell Physiol., 112, 89 (1982)、以下、「PA6 細胞」と略す) またはマウス胎児初代培養繊維芽細胞 (以下、「MEF細胞」と略す) との共培養を行なった。

ES細胞EB5 は未分化特異的プロモーター (Oct3 プロモーター; E. Pikarsky ら、Mol. Cell. Biol., 14, 1026 (1994)) 下に薬剤耐性遺伝子Blastocidine-Rが発現するように遺伝子導入されており、Blastocidine20  $\mu$  g/mlを添加して

培養することで、未分化なES細胞のみを選択し、培養維持することができる。本発明で用いたES細胞EB5 は、試験期間中、Blastocidine20  $\mu$ g/mlを添加した培地中で生存し、未分化な状態を保っていることを確認して用いた。

ES細胞EB5 は、Dulbecco MEM培地に10%の牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum, ES Cell-Qualified; ライテックオリエンタル株式会社製)、2mMグルタミン、100  $\mu$ M MEM Non-Essential Amino Acids溶液、50U/mlペニシリン、50U/mlストレプトマイシン、100  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール、および 1,000 U/ml LIF (ESGRO Murine LIF; ライテックオリエンタル株式会社製) を加えた培地を用い、ゼラチンコートしたプラスチック培養皿上でマニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアルに記載の方法に従って未分化な形質を保ちながら培養した。

PA6 細胞は、10%牛胎児血清 (GIBCO-BRL社製) を含む  $\alpha$ -MEM培地を用い、児玉らの方法 (H. Kodamaら、J. Cell Physiol., 112, 89 (1982)) に従って培養した。

MEF細胞は、Dulbecco MEM培地に10%の牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum, ES Cell-Qualified; ライテックオリエンタル株式会社製)、2mMグルタミン、50U/mlペニシリンおよび 50U/mlストレプトマイシンを加えた培地を用い、マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアルに記載の方法に従って調製し、培養した。

単一細胞状態としたES細胞と、PA6 細胞またはMEF細胞とを共培養することで、ES細胞を分化誘導させた。

単一細胞状態としたES細胞EB5 の調製は、以下のように行った。

培地交換を行い 30%コンフルエント状態にまでES細胞EB5 を増殖させた。培地を除き、PBS(-) を用いて 2 回洗浄した後、1mM EDTAおよび 0.25%トリプシンを含むPBS(-) を加え 37°Cで 20 分間培養した。該培養液を、Glasgow MEM培地に 10%KNOCKOUT SR (GIBCOBRL社製)、2mMグルタミン、100  $\mu$ M MEM Non-

Essential Amino Acids溶液、1mMピルビン酸、50U/mlペニシリン、50U/mlストレプトマイシンおよび 100  $\mu$ M 2-メルカプトエタノールを加えた培地（以下、「無血清培地」と略す）に懸濁した。該懸濁液を、4℃、200×gで 5 分間遠心分離を行ない、沈殿した細胞を再び無血清培地に懸濁することで単一細胞状態としてES細胞EB5 を調製した。

PA6 細胞またはMEF細胞は、あらかじめ培地交換を行ない細胞密度がほぼコンフルエント状態にまで達した細胞を、PBS(-) で 2 回洗浄後、上述の無血清培地を加えることでフィーダー細胞として調製した。

調製したPA6 細胞が培養されている培養器に、単一細胞状態に調製したES細胞EB5 を 10~100 細胞/cm<sup>2</sup>の細胞密度で播種し、4 日目、6 日目、7 日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、37℃で 5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub>インキュベーターにて 8 日間培養した。コントロールとしてゼラチンコートしただけの培養器に上記のES細胞を同様に播種し同様に培養した。

8 日間共培養後、培養器内の培地を除き、4%パラフォルムアルデヒド溶液を加え 30 分間固定した。固定した細胞を、代表的な神経マーカーであるNCAMに対する抗体（Chemicon社製、以下、「抗NCAM抗体」と略す）、神経特異的なマーカーであるクラスIII  $\beta$  チューブリンに対する抗体（Babco社製、以下、「抗チューブリン抗体」と略す）、神経前駆細胞特異的なマーカーであるネスチンに対する抗体（Pharminogen社製、以下、「抗ネスチン抗体」と略す）を用い、Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999) に記載の方法に従って免疫染色を行なった。

上記と同様の方法で、PA6 細胞とES細胞EB5 とを 10 日間共培養した。培養器内の細胞を固定後、ドーパミン作動性神経のマーカーであるチロシン水酸化酵素に対する抗体（Chemicon社製）、コリン作動性神経のマーカーであるVAchTに対する抗体（Cheminco社製）、GABA作動性神経のマーカーであるGADに対する抗体（Chemicon社製）、セロトニン作動性神経のマーカーであるセロトニンに対

する抗体 (Dia Sorin社製) あるいはノルアドレナリン神経マーカーであるドーパミン  $\beta$  水酸化酵素に対する抗体 (PROTOS Biotech社製) を用いて免疫染色を行った。

培養器として組織培養用 3cmデッシュ (プラスチック製、FALCON社製) を用い、1) PA6 細胞をフィーダー細胞として調製したデッシュ、2) MEF細胞をフィーダー細胞として調製したデッシュ、3) ゼラチンコートしただけのデッシュのそれぞれに、200 個のES細胞EB5 を播種し培養した結果を図に示した。

単一細胞状態で播種されたES細胞EB5 は互いに凝集することなくフィーダー細胞あるいはデッシュ表面に付着し、細胞分裂を繰り返しコロニーを形成した (以下、「ES細胞由来のコロニー」あるいは単に「コロニー」という)。

第 1 図はPA6 細胞との共培養の結果、出現したコロニーを (A) 抗NCAM抗体、(B) 抗チューブリン抗体、(C) 抗ネスチン抗体で染色した結果を示した。第 2 図はMEF細胞との共培養の結果、出現したコロニーを抗NCAM抗体で染色した結果を示した。第 3 図はPA6 細胞との共培養の結果出現したコロニーをチロシン水酸化酵素に対する抗体 (以下、「抗チロシン水酸化酵素抗体」と略す) で染色した結果を示した。第 4 図はPA6 細胞との共培養の結果出現したコロニーの中で各種マーカー陽性のコロニーの割合を経時的に示した。コロニーの割合は、上述の 1)、2)、3) のそれぞれの条件で共培養を行ったデッシュを 160 枚づつ用意し、出現した全てのコロニーの染色強度を顕微鏡で観察することによって算出した。

条件 1) のPA6 細胞をフィーダー細胞として調製した共培養系ではES細胞EB5 由来のコロニーの 90% ( $n=160$ ) は第 1 図Aに示すようにNCAM強陽性であった。それらのコロニーでは抗チューブリン抗体 (第 1 図B)、抗ネスチン抗体 (第 1 図C) とともに染色陽性であった。一方、条件 2) のMEF細胞との共培養では有意な神経マーカーの出現は認められなかった (第 2 図)。ゼラチンコートした培養器上で培養したコロニーも、条件 2) のMEF細胞との共培養で出現したコロニー

と同様の染色結果であった。条件 1) の PA6 細胞をフィーダー細胞として調製した共培養系では抗チロシン水酸化酵素抗体に陽性の ES 細胞由来のコロニーが高頻度に出現した (89%) (第 3 図)。PA6 細胞と ES 細胞 EB5 との共培養の結果、経時的には第 4 図に示すように、共培養開始 3 日後からネスチン陽性のコロニーが、4 日後からチューブリン陽性のコロニーが出現している。また、チロシン水酸化酵素陽性のコロニーは 5 日後から出現し、10 日後でピークに達した。この間、ノルアドレナリン神経マーカーであるドーパミン  $\beta$  水酸化酵素に対する抗体による免疫染色は陰性であった。10 日後におけるコリン作動性神経のマーカーである VAchT 陽性のコロニーは 5%, GABA 作動性神経のマーカーである GAD に陽性のコロニーは 15%, セロトニンに陽性のコロニーは 4% であった。

なお、ES 細胞として代表的な 129 系マウス由来の CCE 細胞 (M. R. Kuehn ら、Nature, 326, 295 (1987); ES 細胞を用いた変異マウスの作製) を用いた共培養の場合にも上記と同様の結果が得られた。

## 実施例 2

胚性幹細胞の非神経系外胚葉細胞への分化：

実施例 1 に記載の無血清培地に、0.5nmol/l の BMP4 (R&D 社製) を添加した培地を作製した。作製した BMP4 添加無血清培地を実施例 1 で用いた無血清培地の代わりに用い、実施例 1 に記載した方法に従って ES 細胞 EB5 と PA6 細胞の共培養を行なった。8 日間の培養後、抗 NCAM 抗体、抗ネスチン抗体および非神経外胚葉細胞マーカーである E カドヘリンに対する抗体 (宝酒造社製) を用いて細胞免疫染色を行なった。コントロールとして、BMP4 未添加無血清培地を用いて共培養を行った。結果を第 5 図 A、B、C、D、E、F に示した。

また、BMP4 添加無血清培地を用いて 8 日間培養した後、10% 牛胎児血清 (GIBCOBRL 社製) を含む Glasgow MEM 培地に交換し、さらに 3 日間培養した。培養細胞を 4% パラフォルムアルデヒド溶液を加えて 30 分間固定し、皮膚表皮細

胞マーカーであるケラチン 14 に対する抗体 (Biomedica社製) を用いて、細胞の免疫染色を行なった結果を、牛血清未添加培地を用いてさらに 3 日間培養した場合と比較して第 5 図G、H、Iに示した。

実施例 1 に示したように、BMP4 未添加培地を用いた場合、ES細胞由来のコロニーは抗NCAM抗体強陽性 (第 5 図A)、抗ネスチン抗体強陽性 (第 5 図B) であった。それに対し、Eカドヘリン陽性のコロニーは少数 (18%) であった (第 5 図C)。一方、BMP4 添加無血清培地を用いた培養ではES細胞由来のコロニーは抗NCAM抗体陰性 (第 5 図D)、抗ネスチン抗体陰性 (第 5 図E) であったが、Eカドヘリン陽性のコロニーが高頻度に (98%) 出現した (第 5 図F)。ケラチン 14 陽性のコロニーは、BMP4 未添加培地を用いた場合全く出現しなかった (第 5 図G) が、BMP4 添加無血清培地を用いた培養では 34%の頻度で出現した (第 5 図H)。BMP4 添加無血清培地を用いて 8 日間培養した後、10%牛胎児血清を含む Glasgow MEM培地を用いてさらに 3 日間培養したものでは、ケラチン 14 陽性のコロニーの頻度 (47%) もコロニーのサイズも共に有意に増加した (第 5 図I)。

なお、ES細胞として代表的な 129 系マウス由来のCCE細胞 (M. R. Kuehnら、Nature, 326, 295 (1987); ES細胞を用いた変異マウスの作製) を用いた共培養の場合にも上記と同様の結果が得られた。

### 実施例 3

胚性幹細胞をドーパミン作動性神経細胞へ分化させる活性を有するストローマ細胞の選択:

PA6 細胞、MEF細胞、STO細胞、NIH/3T3 細胞、OP9 細胞、CHO細胞、MDCK細胞、3Y1 細胞あるいはCOS細胞 (以下、「各種細胞」と呼ぶ) とES細胞EB5 との共培養を行なった。

STO細胞はEvansらが記載している方法 (M. J. Evansら、Nature, 292, 154 (1981)) に従って培養した。NIH/3T3 細胞はJainchillらが記載している方法

(J.L. Jainchillら、J. Virol., 4, 549 (1969)) に従って培養した。OP9 細胞は仲野らが記載している方法 (T. Nakanoら、Science, 272, 722 (1996)) に従って培養した。CHO細胞はPuckらが記載している方法 (T.T. Puckら、J. Exp. Med., 108, 945 (1985)) に従って培養した。MDCK細胞はMisfeldtらが記載している方法 (D.S. Misfeldtら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1212 (1976)) に従って培養した。3Y1 細胞はSandineyerらが記載している方法 (S. Sandineyerら、Cancer Res., 41, 830 (1981)) に従って培養した。COS細胞はGluzmanが記載している方法 (Cell, 23, 175 (1981)) に従って培養した。

実施例 1 に記載の方法に従って、上述の各種細胞とES細胞EB5 とを 8 日間共培養し、抗NCAM抗体で免疫染色し、陽性のES細胞由来のコロニーの割合を調べた。その結果、PA6 細胞、OP9 細胞、NIH/3T3 細胞は、それぞれ 95%、45%、10%の陽性率を示し、これら細胞はES細胞に対して有為な神経分化誘導活性を有することが分かった。一方、他の細胞は有意な神経分化誘導活性を示さなかった。

次に、パラフォルムアルデヒドで固定した上述の各種細胞とES細胞との共培養を行なった。

あらかじめ培地交換を行ない細胞密度がほぼコンフルエント状態にまで達した各種細胞を、PBS(-) で 2 回洗浄後、4%パラフォルムアルデヒド溶液を加え 4℃で 30 分間放置することで固定した。固定した細胞をPBS(-) 溶液で数回洗浄することで各種細胞を調製した。

調製した各種細胞をフィーダー細胞として用い、実施例 1 に記載の方法に従ってES細胞EB5 との共培養を行なった。パラホルムアルデヒドで固定した細胞を用いた場合、PA6 細胞、OP9 細胞、NIH/3T3 細胞、MEF細胞、STO細胞との共培養でES細胞の神経細胞への分化が高率に観察されたが、3Y1 細胞、COS細胞、MDCK細胞、CHO細胞との共培養では観察されなかった。このことから、一群のストローマ細胞すなわち、PA6 細胞、OP9 細胞、NIH/3T3 細胞、MEF細胞、STO細胞



胞が神経分化誘導活性を有すること、またその活性がパラホルムアルデヒドで固定しても残存することが分かった。また、MEF細胞、STO細胞では、パラホルムアルデヒド処理により神経分化誘導活性を阻害する機構が解除されることが示唆された。

#### 実施例 4

ストローマ細胞が有する、胚性幹細胞を神経細胞へ分化させる活性の解析：

ストローマ細胞が有する胚性幹細胞を神経細胞へと分化させる活性を解析するために、多孔性フィルターを介してES細胞とストローマ細胞との共培養を行った。

多孔性フィルターとして孔径  $0.45\mu\text{m}$  の 6 穴用セルカルチャーインサート（商品番号 3090、FALCON社製）を用いた。PA6 細胞をセルカルチャーインサートの中側に培養し、フィルター上に接着したPA6 細胞を実施例 1 に記載の方法に従ってフィーダー細胞として調製した。

ゼラチンコートした 6 穴カルチャーディッシュ（FALCON社製）に、実施例 1 に記載した無血清培地に懸濁したES細胞EB5 を 400 個/穴で播種し、上述のPA6 細胞をフィーダー細胞として調製したセルカルチャー・インサートを穴に挿入して培養した。即ち、6 穴カルチャーディッシュ上に播種されたES細胞EB5 と、フィーダー細胞としてセルカルチャー・インサート内に調製されたPA6 細胞とをフィルター膜を介して共培養した。培養開始後 4 日目、6 日目、7 日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、 $37^{\circ}\text{C}$  で 5% の二酸化炭素を通気した  $\text{CO}_2$  インキュベーターにて 8 日間培養した。8 日間共培養後、培地を除き、4% パラホルムアルデヒド溶液を加え 30 分間固定した。固定した細胞を、神経特異的なマーカーであるチューブリンに対する抗体（Babco社製）を用い、Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999) に記載の

方法に従って免疫染色を行なった。チューブリン陽性のコロニーの出現割合をフィルターを介さないで培養した場合として比較して第6図に示した。

PA6細胞とES細胞EB5とをフィルターを介して共培養した場合(第6図、フィルター)は25%のコロニーでチューブリン陽性となった。これはフィルターを介さないで培養した場合(第6図、PA6)に比して1/3程度の効率であるが、PA6細胞なしでゼラチン上で培養した場合(第6図、ゼラチン; 陽性率3%以下)に比して有意に高い神経分化が認められた。

#### 実施例5

ドーパミン作動性神経細胞に分化した胚性幹細胞の脳内移植の解析(その1):

実施例1に記載の方法に従い、PA6細胞をフィーダー細胞として用い、ES細胞EB5をBMP4未添加無血清培地で10日間培養した。すなわち、6cmの組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖したPA6細胞をフィーダー細胞として用い、このフィーダー細胞上にES細胞EB5を2000個/デッシュで播種し、4日目、6日目、8日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、37℃で5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub>インキュベーターにて10日間培養した。

培養の結果分化誘導された細胞を、細胞系譜トレーサーのDiI (Molecular Probe社製)を用い、添付資料に従って蛍光標識した。標識後、Papain Dissociation Systemキット(Worthington社製)を用い、キット添付書類の方法に従ってパパイン酵素処理を室温で5分間行い、形成されたES細胞由来の各コロニーをほぼ一塊としてフィーダー細胞から分離した。なお、コロニー内の神経細胞にダメージを与えることを避けるため、分化誘導により形成された各コロニーをできるだけ一塊としてフィーダー細胞から分離し、移植に用いた。

キットに添付のパパイン阻害剤で酵素を失活させた後、15mlの遠心チューブを用いて300rpmで5分間遠心分離し、分化誘導したES細胞塊を回収した。6cm

ディッシュ 1 枚分より回収された分化誘導ES細胞塊を 5  $\mu$ l のN<sub>2</sub>添加Glasgow MEM培地 (Gibco Lifetech社製) に浮遊させ、下記の移植に用いた。

移植および薬物注入はCurrent Protocols in Neuroscience (John Wiley & Sons 社 (1999)) 3.10 に記載の方法に従って行った。定位脳固定装置 (ナリシゲ社製) にネンブタールで麻酔したC57BL/6 マウスを固定し、The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Academic Press社製 (1997)) に従って線条体を位置同定した。局所のドーパミン神経を破壊するために、6-hydroxydopamine (2,4,5-trihydroxyphenethylamine)hydrobromide (以下、「6-OHDA」という) をPBSに 8 mg/mlで溶解し、これを微小ガラス管を用いて、片側の線条体の吻側と尾側に 1カ所 4  $\mu$ lずつ計 2カ所注入した。一部のマウスでは 3 日後、注入側の錐体外路症状を確認した上で、針先平坦の 26Gハミルトンシリンジを用いて同側の線条体中央付近に上述の方法で神経細胞に分化誘導させたES細胞塊の浮遊液 2  $\mu$ lを 4 分間かけて注入した。6-OHDA処理より 8 日後、マウス脳を灌流固定して組織標本を作製し、それを、ドーパミン作動性神経のマーカーであるチロシン水酸化酵素に対する抗体 (Chemicon社製) とドーパミントランスポーターに対する抗体 (Chemicon社製) を用いて免疫染色を行った。

ドーパミン神経の破壊のため 6-OHDAで処理し細胞移植を行わなかった群では、同側の線条体内においてチロシン水酸化酵素およびドーパミントランスポーターを発現している神経組織は正常の 40%以下になっていた (n=6)。それに対し、分化誘導したES細胞の移植を行った群ではDiI標識された移植片を中心に、同側の線条体内におけるチロシン水酸化酵素およびドーパミントランスポーターの発現領域が有為に回復し、全体で 75%程度となり (n=6)、移植によるドーパミン作動性神経細胞の回復が観察された。

## 実施例 6

ドーパミン作動性神経細胞に分化した胚性幹細胞の脳内移植の解析 (その 2):

実施例 1 に記載した方法に従い、PA6 細胞をフィーダー細胞として用い、ES 細胞EB5 をBMP4 未添加無血清培地で 8 日間培養した。すなわち、6cmの組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖したPA6 細胞をフィーダー細胞として用い、このフィーダー細胞上にES細胞EB5 を 2000 個/デッシュで播種し、4 日目、6 日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、37℃で 5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub>インキュベーターにて 8 日間培養した。

その後さらに、2mmol/lグルタミン、1mmol/lピルビン酸、0.1mmol/l MEM Non-Essential Amino Acids溶液、0.1mmol/l 2-メルカプトエタノール、およびN<sub>2</sub> (GIBCO BRL社製、100 倍原液を 100 分の 1 添加) を添加したGlasgow MEM 培地 (以下、「N<sub>2</sub> 添加Glasgow MEM培地」と表記する。) を用い 4 日間培養した。

培養後、マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアルに記載の方法に従い 10  $\mu$ g/mlマイトマイシンC (MMC) を含む培地 (上記Glasgow MEM培地) で 2 時間培養を行った。

上記培養の結果分化誘導された細胞を、Papain Dissociation systemキット (Worthington社製) を用い、添付書類の方法に従ってパパイン酵素処理を室温で 5 分間キット行い、形成されたES細胞由来の各コロニーをほぼ一塊としてフィーダー細胞から分離した (なお、コロニー内の神経細胞に損傷を与えることを避けるため、分化誘導により形成された各コロニーをできるだけ一塊としてフィーダー細胞から分離した)。コロニーを分離後、コロニーを形成する細胞を細胞系譜トレーサーの DiI (Molecular Probe社製) を用い添付資料に従い、5  $\mu$ g/ml CM-DiI、4mg/mlグルコースを含むPBS溶液中で室温 20 分間反応させることで蛍光標識した。標識後、N<sub>2</sub> 添加Glasgow MEM培地を用いて洗浄し、N<sub>2</sub> 添加

Glasgow MEM培地  $1\mu\text{l}$ に約  $4\times 10^5$  個の細胞が含まれるように調製し、下記の移植に用いた。

移植および薬物注入はCurrent Protocols in Neuroscience (John Wiley & Sons 社、1999) 3.10 に記載の方法に従って行った。定位脳固定装置 (ナリシグ社製) にネンプタールで麻酔したC57BL/6 マウスを固定し、The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Academic Press社、1997) に従って線条体を位置同定した。局所のドーパミン神経を破壊する 6-OHDAをPBSに  $8\mu\text{g}/\mu\text{l}$ で溶解し、これを微小ガラス管を用いてThe Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Academic Press社製、1997) に従い片側の線条体に 1カ所  $0.5\mu\text{l}$  ずつ計 3カ所 ((A+0.5, L+2.0, V+3.0) (A+1.2, L+2.0, V+3.0) (A+0.9, L+1.4, V+3.0)) に注入した。一部のマウスでは 3 日後、注入側の錐体外路症状を確認した上で、針先平坦の 26Gハミルトンシリンジを用いて同側の線条体中央付近 (A+0.9, L+2.0, V+3.0) に上述の方法で神経細胞に分化誘導させたES細胞塊の浮遊液  $1\mu\text{l}$ を 3 分間かけて注入した。対照群には  $1\mu\text{l}$ の $\text{N}_2$ 添加 Glasgow MEM培地を注入した。6-OHDA処理より 14 日後マウス脳を灌流固定し、ドーパミン作動性神経のマーカーであるチロシン水酸化酵素に対する抗体 (Chemicon社製) とドーパミントランスポーターに対する抗体 (Chemicon社製) を用いて免疫染色を行った。

ドーパミン神経を破壊する 6-OHDAで処理し細胞移植を行わなかった群では、同側の線条体内においてチロシン水酸化酵素およびドーパミントランスポーターを発現している神経組織は正常の 15%以下になっていた ( $n=5$ )。それに対し、細胞移植を行った群ではDiI標識された移植片を中心に、同側の線条体内におけるチロシン水酸化酵素およびドーパミントランスポーターの発現領域が有意に回復し、全体で 50%程度となった ( $n=5$ )。また、移植 2 週間後においても奇形腫テラトーマの形成は観察されなかった。

## 実施例 7

胚性幹細胞の神経性外胚葉細胞への分化過程の解析：

実施例 1 に記載の方法に従い、PA6 細胞をフィーダー細胞として用い、ES細胞EB5 をBMP4 未添加無血清培地で 8 日間培養した。すなわち、3cmの組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖したPA6 細胞をフィーダーとして用い、このフィーダー細胞上にES細胞EB5 を 200 個/デッシュで播種し、4 日目、6 日目、7 日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、37℃で 5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub>インキュベーターにて 8 日間培養した。

8 日間共培養後、実施例 1 に記載の方法に従って細胞を固定し、抗NCAM抗体、抗クラスIII  $\beta$  チューブリン抗体、抗ネスチン抗体、プレシナプス特異的なマーカーであるシナプトフィジン (synaptophysin) に対する抗体 (Sigma社製)、神経上皮細胞 (neuroepithelium) を認識するRC2 抗体 (Developmental Studies Hybridoma Bank 社製)、中胚葉細胞を認識するMF20 抗体 (Developmental Studies Hybridoma Bank社製)、同じく中胚葉細胞においてその発現が観察されているPDGF受容体  $\alpha$  およびFlk1 に対する抗体 (S. I. Nishikawaら、Development, 125, 1747 (1998)) を用いてES細胞EB5 とPA6 細胞との共培養の結果出現したコロニーの免疫染色を行った。

ES細胞EB5 とPA6 細胞の共培養の結果出現したコロニーのほとんどは、実施例 1 で示した結果同様、抗NCAM抗体で染色された。また、抗体二重染色の結果、抗チューブリン抗体陽性のコロニーは抗シナプトフィジン抗体によって染色され、ネスチン陽性のコロニーは抗RC2 抗体によって染色された。一方、中胚葉細胞のマーカーであるPDGF受容体  $\alpha$ 、Flk1、およびMF20 に対する各種抗体で染色されるコロニーは全コロニー2%以下とほとんど観察されなかった。従って、PA6 細胞との共培養によるES細胞の神経細胞誘導の過程には中胚葉系細胞の誘導は実質的に伴わないことが示唆された。

なお、ES細胞として代表的な 129 系マウス由来のCCE細胞 (M. R. Kuehnら、Nature, 326, 295 (1987); ES細胞を用いた変異マウスの作製) を用いた共培養の場合にも上記と同様の結果が得られた。

#### 実施例 8

胚性幹細胞の非神経性外胚葉細胞への分化過程の解析：

実施例 1 に記載の無血清培地に 0.5nmol/lのBMP4 (R&D社製) を添加した培地を作製した。作製したBMP4 添加無血清培地を実施例 1 で用いた無血清培地の代わりに用い、実施例 1 に記載した方法に従ってES細胞EB5 とPA6 細胞との共培養を行った。すなわち、3cmの組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖したPA6 細胞をフィーダーとして用い、このフィーダー細胞上にES細胞を 200 個/デッシュで播種し、4 日目、6 日目、7 日目に新鮮な培地を用いて培地交換を行い、37℃で 5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub> インキュベーターにて 8 日間培養した。

8 日間共培養後、実施例 1 に記載の方法に従って細胞を固定し、抗NCAM抗体、抗Eカドヘリン抗体、中胚葉細胞を認識するMF20 抗体 (Developmental Studies Hybridoma Bank社製)、同じく中胚葉細胞においてその発現が観察されているPDGF受容体 $\alpha$ およびFlk1 に対する抗体 (S. I. Nishikawaら、Development, 125, 1747 (1998)) を用いてES細胞とPA6 細胞の共培養の結果出現したコロニーの免疫染色を行った。

ES細胞とPA6 細胞をBMP4 添加無血清培地を用い共培養することで、実施例 2 で示した結果と同様、NCAM陰性Eカドヘリン陽性のコロニーが高頻度に出現した。一方、中胚葉細胞のマーカーであるPDGF受容体 $\alpha$ 、Flk1、およびMF20 に対する各種抗体で染色されるコロニーは全コロニーの 5%以下とほとんど観察されなかった。従って、BMP4 存在下、PA6 細胞との共培養によるES細胞の非神経

系外胚葉細胞への誘導の過程には中胚葉系細胞の誘導は実質的に伴わないことが示唆された。

なお、ES細胞として代表的な 129 系マウス由来のCCE細胞 (M. R. Kuehnら、Nature, 326, 295 (1987); ES細胞を用いた変異マウスの作製) を用いた共培養の場合にも上記と同様の結果が得られた。

#### 実施例 9

胚性幹細胞から分化誘導された神経細胞コロニーの解析：

実施例 1 に記載の方法に従い、PA6 細胞をフィーダー細胞として用い、ES細胞EB5 をBMP4 未添加無血清培地で 12 日間培養した。すなわち、3cmの組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖したPA6 細胞をフィーダーとして用い、このフィーダー細胞上にES細胞を 200 個/デッシュで播種し、4 日目、6 日目、8 日目、10 日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、37℃で 5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub> インキュベーターにて 12 日間培養した。

10 日間共培養後、一部のデッシュの細胞を実施例 1 に記載の方法に従って固定し、チロシン水酸化酵素、VAchT、GAD、セロトニンに対する抗体を用いてES細胞EB5 とPA6 細胞との共培養の結果出現したコロニーの免疫染色を行った (n=200)。

ES細胞EB5 とPA6 細胞との共培養の結果出現したコロニーのうち、92%がドーパミン作動性神経細胞のマーカであるチロシン水酸化酵素陽性、43%がGABA作動性神経細胞のマーカであるGAD陽性、28%がコリン作動性神経細胞のマーカであるVAchT陽性、7%がセロトニン陽性であった。

引き続き、残りのデッシュの培養を続け、12 日間培養後に実施例 1 に記載の方法に従って細胞を固定し、クラスIII  $\beta$  チューブリン、ネスチン、チロシン水酸化酵素に対する抗体を用いてES細胞EB5 とPA6 細胞との共培養の結果出現したコロニーの免疫染色を行った。また、コロニーを形成する全細胞の数を測



定する為に、Molecular Probe社のキットYOYO-1 を用いた核染色を行った。核染色後、ES細胞EB5 とPA6 細胞の共培養の結果出現したコロニー (n=20) をランダム選択し、共焦点顕微鏡で観察する事によって染色された細胞数をカウントした (n=5050)。

カウントした全細胞のうち、クラスIII  $\beta$  チューブリン陽性細胞、ネスチン陽性細胞、チロシン水酸化酵素陽性細胞の割合はそれぞれ、 $52 \pm 9\%$ 、 $47 \pm 10\%$ 、 $30 \pm 4\%$ であった。

なお、ES細胞として代表的な 129 系マウス由来のCCE細胞 (M. R. Kuehnら、Nature, 326, 295 (1987); ES細胞を用いた変異マウスの作製) を用いた共培養の場合にも上記と同様の結果が得られた。

#### 実施例 10

胚性幹細胞から分化誘導されたドーパミン作動性神経細胞の解析 (その 1) :

実施例 1 に記載の方法によって、胚性幹細胞から分化誘導される神経細胞の性質をより詳細に解析する為に、中脳のドーパミン作動性神経細胞のマーカーであるNurr1 (R.H. Zetterstromら、Science, 276, 248 (1997)) およびPtx3 (M.P. Smidtら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 13305 (1997)) の該分化誘導に伴う発現変化をRT-PCR法にて調べた。

細胞の調製は以下のように行った。

実施例 1 に記載の方法に従い、PA6 細胞をフィーダー細胞として用い、ES細胞EB5 をBMP4 未添加無血清培地で 12 日間培養した。すなわち、9cmの組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖したPA6 細胞をフィーダーとして用い、このフィーダー細胞上にES細胞EB5 を  $5 \times 10^4$  個/デッシュで播種し、4 日目、6 日目、8 日目、10 日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、 $37^\circ\text{C}$ で5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub>インキュベーターにて 12 日間培養した。

また、実施例 1 で示したES細胞培養用培地を用い、9cmの組織培養用デッシュにES細胞EB5 を  $5 \times 10^4$  個/デッシュで播種し、4 日目、6 日目、8 日目、10 日目に新鮮な培地を用いて培地交換を行い、37℃で 5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub>インキュベーターにて 12 日間培養した細胞を対照として調製した。

上記調製した分化誘導した細胞および対照ES細胞における、Nurr1 および Ptx3 のmRNAレベルでの発現を検出する為に、マウス胎生 12 日の胎児頭部をポジティブコントロールとして用い、笹井らによって報告されている方法 (Y. Sasaiら、Nature, 376, 333 (1995)) に準じてRT-PCRを行った。すなわち、細胞を調製したデッシュおよび胎生 12 日の胎児頭部から、Trizol試薬 (GIBCO BRL社製) を用い添付マニュアルに従って全RNAを調製し、SUPER SCRIPT Preamplification System for first strand cDNA Synthesis (GIBCO BRL社製) を用いてcDNAを合成した。合成したcDNAを滅菌水を用いて 50 倍に希釈した溶液を材料にして常法により反応液 (10mmol/l Tris-HCl (pH8.3), 50mmol/l KCl, 1.5mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0.2mmol/l dNTP, 0.2  $\mu$ mol/l遺伝子特異的プライマー (配列表に記載), 1 unit recombinant Ex Taq polymerase (宝酒造社製)) を調製後、94℃で 3 分間反応させ、次いで 94℃で 30 秒間、55℃で 30 秒間、72℃で 1 分間のサイクルを 30 サイクル反復し、最後に 72℃で 7 分間反応させ、4℃で一晩保存する条件でPCRを行った。該反応液をアガロースゲル電気泳動し用いたプライマーに特異的なDNAバンドの濃さを比較することで、各種因子の発現量の半定量的な比較を行った。

なお、配列番号 1 および 2 で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをNurr1 特異的プライマーとして、配列番号 3 および 4 で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをPtx3 特異的プライマーとして、配列番号 5 および 6 で表される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをG3PDH特異的プライマーとして各々用いた。Ptx3 特異的プライマーを用いてPCRを行う場合にはDMSOを終濃度 5%になるように反応液中に添加して行った。

ES細胞とPA6細胞を12日間共培養した結果、実施例1で示した結果と同様に神経細胞様のコロニーが出現した。また、この分化誘導されたコロニーを含む細胞集団では、ポジティブコントロールと同様に、有為なNurr1およびPtx3の発現が観察された(第7図: ES+PA6)。一方、対照としたES細胞ではNurr1およびPtx3の発現が検出されなかった(第7図: ES)。なお、9cmの組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖したPA6細胞を対照に上述の条件でRT-PCRを行っても、Nurr1およびPtx3の発現は検出されなかった。従って、PA6細胞との共培養によって胚性幹細胞が神経細胞に分化誘導されるに伴い中脳のドーパミン作動性神経細胞のマーカーであるNurr1およびPtx3の発現が上昇していることが分かった。

なお、ES細胞として代表的な129系マウス由来のCCE細胞(M. R. Kuehnら、Nature, 326, 295 (1987); ES細胞を用いた変異マウスの作製)を用いた共培養の場合にも上記と同様の結果が得られた。

#### 実施例 11

胚性幹細胞から分化誘導されたドーパミン作動性神経細胞の解析(その2):

実施例1に記載の方法によって、胚性幹細胞から分化誘導される神経細胞の性質をより詳細に解析する為に、ドーパミンの生産量を常法(K. Inoue & J. G. Kenimerら、J. Biol. Chem., 263, 8157 (1988); 今泉美佳、熊倉鴻之助、実験医学別冊 神経生化学マニュアル、p191-200 (1990))に従いHPLCを用いて定量した。

細胞からの測定試料の調製は以下のように行った。

実施例1に記載の方法に従い、PA6細胞をフィーダー細胞として用い、ES細胞EB5をBMP4未添加無血清培地で8日間培養した。すなわち、9cmの組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖したPA6細胞をフィーダーとして用い、このフィーダー細胞上にES細胞を $5 \times 10^4$ 個/デッシュで播種し、4日

目、6 日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、37℃で 5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub> インキュベーターにて 8 日間培養した。その後さらに、2mmol/l グルタミン、1mmol/l ピルビン酸、0.1mmol/l MEM Non-Essential Amino Acids溶液、0.1mmol/l 2-メルカプトエタノール、0.2mmol/l アスコルビン酸、0.1mmol/lテトラヒドロビオプテリン (Tetrahydrobiopterin)、およびN<sub>2</sub>を添加したGlasgow MEM培地を用い 6 日間培養した。培養後、緩衝液HBSS (GIBCO BRL社製) を用いて 2 回洗浄し、洗浄した細胞を 56mmol/l KClを含むHBSS溶液中で 15 分間培養した。15 分後、培養液を回収し、終濃度が 0.4mol/l 過塩素酸 (Perchloric acid) および 5mmol/l EDTAとなるように調整し、測定試料として-80℃で保存した。

上述のES細胞とPA6 細胞との共培養により約 100 万細胞程度のES細胞由来分化細胞が出現した。また、出現した細胞を用いて調製した測定試料中のドーパミンの定量は、逆相-HPLCを用いたMonoamine Analysis System (Eicom Corp., Kyoto, Japan) を用いて行った。結果を第 8 図に示した。

PA6 細胞との共培養により胚性幹細胞から分化した神経細胞は、56mmol/l KClの脱分化刺激により有為な量のドーパミンを遊離していることが分かった (7.7pmol/10<sup>6</sup> 細胞 (ES細胞由来分化細胞))。また、ドーパミン派生物質であるDOPAC (3,4-dihydroxyphenylacetic acid) およびHVA (homovanillic acid) も、有為な量が検出された (それぞれ、2.5pmol/10<sup>6</sup> 細胞 (ES細胞由来分化細胞) および 4.0pmol/10<sup>6</sup> 細胞 (ES細胞由来分化細胞))。

従って、PA6 細胞との共培養によって胚性幹細胞から分化誘導されたドーパミン作動性神経細胞は、ドーパミンを産生し機能的な神経として作用し得る能力を有していることがインビトロにおいても示唆された。

## 実施例 12

原始外胚葉を構成する細胞のドーパミン作動性神経細胞への分化：

ES細胞EB5の代わりにマウス胎生6日目の原始外胚葉 (Pre-streak epiblast) から単離した細胞を用い、実施例1あるいは2に記載した方法に従ってPA6細胞との共培養を行った。

マウス胎生6日目の原始外胚葉を構成する細胞の単離および培養は、マニピュレイティング・ザ・マウス・エンブリオ・ア・ラボラトリー・マニュアルに記載の方法に従って行った。

実施例1に記載の方法に従い、PA6細胞をフィーダー細胞として用い、単離した胚細胞をBMP4未添加無血清培地で8日間培養した。すなわち、3cmの組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖したPA6細胞をフィーダーとして用い、このフィーダー細胞上に単離した原始外胚葉細胞を200個/デッシュで播種し、4日目、6日目、7日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、37℃で5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub>インキュベーターにて8日間培養した。

また、実施例1で用いた無血清培地に0.5nmol/lのBMP4 (R&D社製) を添加した培地を用い、実施例1に記載した方法に従って単離した胚細胞とPA6細胞との共培養を行った。すなわち、3cmの組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖したPA6細胞をフィーダーとして用い、このフィーダー細胞上にES細胞を200個/デッシュで播種し、4日目、6日目、7日目に新鮮な培地を用いて培地交換を行い、37℃で5%の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub>インキュベーターにて8日間培養した。

8日間共培養後、実施例1に記載の方法に従って細胞を固定し、抗NCAM抗体、抗チューブリン抗体、抗ネスチン抗体、抗Eカドヘリン抗体を用いて単離した胚細胞とPA6細胞の共培養の結果出現したコロニーの免疫染色を行った。

単離した原始外胚葉の胚細胞を用いた場合でも、ES細胞EB5 を用いて行った実施例 1 および 2 の結果と同様の結果を得、神経系細胞および表皮系細胞の出現が観察された。

### 実施例 13

ストローマ細胞が有する、胚性幹細胞を外胚葉系の細胞に分化誘導させる因子の回収：

実施例 3 に記載の方法に従い、パラフォルムアルデヒド固定したPA6 細胞をフィーダー細胞として用い、ES細胞EB5 をBMP4 未添加無血清培地で 8 日間培養した。この際、PA6 細胞をヘパリン (GIBCO BRL社製) を含む培地で培養した場合 (以下、「ヘパリン処理」という) と、ヘパリン無添加の培地で培養した場合との比較を行った。すなわち、3cmの組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖したPA6 細胞を 200ng/mlヘパリンを含む培地で 2 日間培養したデッシュと、ヘパリン無添加の培地で 2 日間培養したデッシュを調製し、PBS(-) で 2 回洗浄後パラフォルムアルデヒド固定を行い、これらパラフォルムアルデヒド固定したPA6 細胞上にES細胞EB5 を 200 個/デッシュで播種し、4 日目、6 日目、7 日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、37℃で 5% の二酸化炭素を通気したCO<sub>2</sub> インキュベーターにて 8 日間培養した。

8 日間培養後、実施例 1 に記載の方法に従って細胞を固定し、抗NCAM抗体、抗チューブリン抗体、抗ネスチン抗体を用いてES細胞EB5 とPA6 細胞との共培養の結果出現したコロニーの免疫染色を行った。

ヘパリン処理を施さなかったPA6 細胞をフィーダー細胞として用いた場合には、実施例 3 で示した結果同様、90%近くのES細胞由来のコロニーがNCAM陽性であり、ES細胞の神経細胞への分化が高率で観察された。一方、ヘパリン処理を施したPA6 細胞をフィーダー細胞として用いた場合にはES細胞の神経細胞への有為な分化は観察されなかった。このことより、ストローマ細胞が有する胚

性幹細胞を外胚葉系の細胞に分化誘導する活性は、Wnts分子で観察されている現象 (R. S. Bradley & A. M. C. Brown、EMBO J., 9, 1569 (1990)) と同様に、ストローマ細胞をヘパリンを含む培地で培養することで培養上清中に回収できる事が示唆された。

#### 実施例 14

胚性幹細胞の、背腹軸に沿った多様な神経系の細胞への分化誘導：

中枢神経系の発生において背腹軸に沿った神経の多様性を決定する因子であるshhやBMP4 の効果を調べるために、以下のようにしてストローマ細胞上で分化を開始したES細胞にこれら因子を作用させその影響を調べた。

実施例 1 に記載の方法に従い、PA6 細胞をフィーダー細胞として用い、ES細胞EB5 をshhおよびBMP4 を添加していない無血清培地で 10 日間培養した。すなわち、3cmの組織培養用デッシュ上でほぼコンフルエントにまで増殖したPA6 細胞をフィーダーとして用い、このフィーダー細胞上にES細胞を 200 個/デッシュで播種し、4 日目、6 日目、8 日目に新鮮な無血清培地を用いて培地交換を行い、37℃で 5%CO<sub>2</sub>を通気したインキュベーターにて 10 日間培養した。

shhの効果は、上記と同様の培養方法で、4 日目、6 日目、8 日目の培地交換の際、300nmol/lのshh (R&D社製) を添加した無血清培地を用いることで評価した。

BMP4 の効果は、上記と同様の培養方法で、6 日目、8 日目の培地交換の際、0.5nmol/lのBMP4 (R&D社製) を添加した無血清培地を用いることで評価した。

10 日間共培養後、実施例 1 に記載の方法に従ってそれぞれの培養方法で培養した細胞を固定し、抗NCAM抗体、中枢神経系原基 (神経管) の最も腹側に存在する底板のマーカーであるHNF-3  $\beta$  に対する抗体 (Developmental Studies Hybridoma Bankより購入)、HNF-3  $\beta$  について腹側から 2 番目に存在するマーカーであるNkx2.2 に対する抗体 (Developmental Studies Hybridoma Bankより購

入)、神経管背側のマーカーであるPax-7 に対する抗体 (Developmental Studies Hybridoma Bankより購入)、神経堤細胞のマーカーであるAP-2 に対する抗体 (Developmental Studies Hybridoma Bankより購入)、運動神経のマーカーであるislet 1 に対する抗体 (Developmental Studies Hybridoma Bankより購入)、コリン作動性ニューロンのマーカーであるVAchTに対する抗体 (Chemicon社製) をそれぞれ用いて、ES細胞とPA6 細胞の共培養の結果出現したコロニーの免疫染色を行った。

shhあるいはBMP4 添加に関わらず、ES細胞EB5 とPA6 細胞の共培養の結果出現したコロニーのほとんどは、実施例 1 で示した結果同様、抗NCAM抗体で染色され、いずれの場合も、ES細胞由来のコロニーの90%が陽性であった。

他のマーカーに対する抗体で染色されるES細胞由来のコロニーの割合と共に以下の表 1 に示す。

表 1

抗体	対照	shh添加	BMP4 添加
抗NCAM抗体	90%	90%	90%
抗HNF-3 $\beta$ 抗体	70%	81%	9%
抗Nkx2. 2 抗体	44%	85%	19%
抗Pax-7 抗体	30%	0%	72%
抗AP-2 抗体	16%	0%	24%
抗islet 1 抗体	82%	82%	36%
抗VAchT抗体	36%	58%	42%

以上の結果から、PA6 細胞との共培養によるES細胞の神経細胞誘導では、神経マーカーであるNCAMのみならず、各種タイプのニューロン特異的なマーカーを発現する神経系の細胞が出現していることが示された。すなわち、PA6 細胞



との共培養によるES細胞の分化誘導では、中枢神経系原基（神経管）の最も腹側の底板に位置するHNF-3 $\beta$ を発現している神経系の細胞、中枢神経系原基（神経管）の腹側からHNF-3 $\beta$ について2番目に存在するマーカーNkx2.2を発現している神経系の細胞、Pax-7を発現している神経管背側の神経細胞、AP-2を発現している神経堤の細胞、islet 1を発現している運動神経細胞に分化誘導される。

また、胚の神経発生過程で背腹軸の決定に関与することが明らかにされているshhやBMP4に、胚の神経前駆細胞がインビボにおいて示す分化能と同様の分化能を示したことから、PA6細胞とのES細胞を共培養することで、背腹軸が決定される前の段階の神経管の細胞が誘導されていることが示された。すなわち、この神経管の細胞では、神経管の腹側化因子であるshhの作用により、腹側マーカーHNF-3 $\beta$ およびNkx2.2の発現誘導が観察され、背側マーカーPax-7およびAP-2の発現抑制が観察される。また、神経管の背側化因子であるBMP4を作用させた場合には、反対に、腹側マーカーHNF-3 $\beta$ およびNkx2.2の発現抑制が観察され、背側マーカーPax-7およびAP-2の発現誘導が観察される。

なお、ES細胞として代表的な、129系マウス由来のCCE細胞（M. R. Kuehnら、Nature, 326, 295 (1987)；ES細胞を用いた変異マウスの作製）を用いた場合にも同様の結果が得られた。

#### 実施例 15

ストローマ細胞PA6を認識するモノクローナル抗体の作製：

##### (1) 免疫原の調製

PA6細胞を免疫原として用いた。PA6細胞は、実施例1に記載した方法に従って培養した。細胞密度がほぼコンフルエント状態にまで達したPA6細胞を、PBS(-)で2回洗浄後、10 $\mu$ g/mlアクチナーゼ（科研製薬社製）および0.02% EDTAを含むPBS(-)溶液を加え37℃で30分間培養し、10%牛胎児血清（GIBCO-

BRL社製)を含む $\alpha$ -MEM培地を加えてアクチナーゼの作用を止め、4℃で 1000×g、5 分間遠心分離することで回収した。回収した細胞は、PBS(-) に再度懸濁し再び 4℃で 1000×g、5 分間遠心分離することで洗浄した。PBS(-) で 2 度洗浄した細胞  $10^7$  個を 1mlPBS(-) に懸濁し免疫原として用いた。

## (2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

上記 (1) で調製した細胞  $10^7$  個を水酸化アルミニウムアジュバント (アンチボディ・ア・ラボラトリー・マニュアル, p. 99) 2mgおよび百日咳ワクチン (千葉県血清研究所製)  $1 \times 10^9$  細胞とともに 6~8 週令雌SDラット各 3 匹に投与した。投与 2 週間後より、上記 (1) で調製した細胞  $10^7$  個を 1 週間に 1 回、計 4 回投与した。該ラットの頸動脈より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したマウスから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。

摘出した脾臓をMEM (Minimum Essential Medium) 培地 (日水製薬社製) 中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離 (250×g、5 分間) した。得られた沈殿画分にトリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.6) を添加し、1~2 分間処理することにより赤血球を除去した。得られた沈殿画分 (細胞画分) をMEM培地で 3 回洗浄し、細胞融合に用いた。

## (3) 酵素免疫測定法 (バインディングELISA)

PA6 細胞を 96 ウェルのEIA用プレート (グライナー社製) の各ウェルに播種し、コンフルエント状態にまで増殖させたプレートを抗原プレートとして用いた。該プレートに被免疫ラット抗血清あるいはモノクローナル抗体の培養上清を  $50 \mu\text{l}$ /ウェルで分注し、37℃で 1 時間放置した。1 時間後、添加した抗血清あるいは培養上清を除き、0.25%グルタルアルデヒドを含むPBS(-) を添加し室温で 30 分間放置した。該プレートを 0.05%ポリオキシエチレン (20) ソル

ビタンモノラウレート (ICI社商標Tween20 相当品 : 和光純薬社製) / PBS (以下、「Tween-PBS」と表記) で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン (DAKO社製) を  $50 \mu\text{l}$ /ウェル加えて室温、1 時間放置した。該プレートをTween-PBSで洗浄後、ABTS基質液 (2, 2-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸) アンモニウム、 $1\text{mmol/l}$ ABTS/  $0.1\text{mol/l}$ クエン酸バッファー (pH4.2)) を添加し、 $415\text{nm}$ における吸光度をプレートリーダー (Emax ; Molecular Devices社製) を用いて測定した。

#### (4) マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞株P3X63Ag8U.1 (P3-U1 : ATCCより購入) を正常培地 (10%ウシ胎児血清添加RPMI培地) で培養し、細胞融合時に  $2 \times 10^7$  個以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

#### (5) ハイブリドーマの作製

実施例 15 (2) で得られたマウス脾細胞と実施例 15 (4) で得られた骨髓腫細胞とを 10 : 1 になるよう混合し、遠心分離 ( $250 \times g$ , 5 分間) した。得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、 $37^\circ\text{C}$ で、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 2g、MEM培地 2mlおよびジメチルスルホキシド  $0.7\text{ml}$ の混液を  $10^6$  個のマウス脾細胞あたり  $0.5\text{ml}$ 加え、該懸濁液に 1~2 分間毎にMEM培地  $1\text{ml}$ を数回加えた後、MEM培地を加えて全量が  $50\text{ml}$ になるようにした。

該懸濁液を遠心分離 ( $900\text{rpm}$ , 5 分間) し、得られた沈澱画分の細胞をゆるやかにほぐした後、該細胞を、メスピペットによる吸込み吸出しでゆるやかにHAT培地 (10%ウシ胎児血清添加RPMI培地にHAT Media Supplement (ベーリンガーマンハイム社製) を加えた培地)  $100\text{ml}$ 中に懸濁した。該懸濁液を 96 ウェ

ル培養用プレートに 200  $\mu$ l/ウェルずつ分注し、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37°Cで 10～14 日間培養した。

培養後、培養上清を実施例 15 (3) に記載した酵素免疫測定法で調べ、PA6 細胞に反応して 1%BSAを含むPBS(-) (以下、「1%BSA-PBS(-)」 溶液と略す) でコートしたコントロールプレートに反応しないウェルを選び、そこに含まれる細胞から限界希釈法によるクローニングを 2 回繰り返す、抗PA6 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立した。その結果、PA6 細胞を抗原に用いて、3 種類の抗ヒトPA6 細胞抗体KM1306、KM1307、KM1310 を取得した。

KM1310 産生ハイブリドーマ細胞株は、FERM BP-7573 として平成 13 年 4 月 27 日付けで、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566)) に寄託されている。

#### (6) モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理した 8 週令ヌード雌マウス (BALB/c) に実施例 15 (5) で得られたハイブリドーマ株を  $5 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$ /匹それぞれ腹腔内注射した。10～21 日後、ハイブリドーマが腹水癌化することにより腹水のたまったマウスから、腹水を採取 (1～8ml/匹) した。

該腹水を遠心分離 (1200×g、5 分間) し固形分を除去した。精製IgMモノクローナル抗体は、硫酸沈殿法 (アンチボディ・ア・ラボラトリー・マニュアル) により精製することにより取得した。モノクローナル抗体のサブクラスはサブクラスタイピングキットを用いたELISA法により、KM1306、KM1307、KM1310 すべてがIgMと決定された。

## (7) 蛍光抗体法（セルソーター解析）によるPA6細胞との反応性の解析

PA6細胞は、実施例1に記載した方法に従って培養した。細胞密度がほぼコンフルエント状態にまで達したPA6細胞を、PBS(-)で2回洗浄後、 $10\mu\text{g/ml}$ アクチナーゼ（科研製薬社製）および0.02%EDTAを含むPBS(-)溶液を加え $37^{\circ}\text{C}$ で30分間培養し、10%牛胎児血清（GIBCO-BRL社製）を含む $\alpha$ -MEM培地を加えてアクチナーゼの作用を止め、 $4^{\circ}\text{C}$ で $1000\times g$ 、5分間遠心分離することで回収した。回収した細胞を10%牛胎児血清（GIBCO-BRL社製）を含む $\alpha$ -MEM培地に懸濁し、 $1\times 10^6$ 細胞ずつ1.5mlチューブに分注した。分注した細胞を、1%BSA-PBS(-)溶液に懸濁し $1000\times g$ 、5分間遠心分離することで2度洗浄した。洗浄した細胞を、 $10\mu\text{g/ml}$ の精製抗体（あるいは $50\mu\text{g/ml}$ 硫安沈殿抗体画分）を含む1%BSA-PBS(-)溶液に懸濁し $37^{\circ}\text{C}$ で30分間培養することで抗体と反応させた。抗体と反応させた細胞を常法に従い蛍光標識した二次抗体と反応させセルソーターを用いて解析した（アンチボディ・ア・ラボラトリー・マニュアル）。すなわち、抗体と反応させた細胞を $1000\times g$ 、5分間遠心分離することで回収し、二次抗体を含む1%BSA-PBS(-)溶液に懸濁し $37^{\circ}\text{C}$ で30分間培養し、1%BSA-PBS(-)溶液で2回洗浄後、2mlの1%BSA-PBS(-)溶液に懸濁しセルアナライザー（コールター社；EPICS XLsystem II）にて解析した。二次抗体としてFITC標識抗ラットイムノグロブリン抗体（FITC標識ヤギ抗ラットイムノグロブリン（H+L）；CALTAG社製）を30倍希釈した1%BSA-PBS(-)溶液を用い、 $100\mu\text{l}$ /チューブで使用した。コントロール抗体としてラットIgMの老化抑制タンパク質を認識するモノクローナル抗体であるKM2070を $10\mu\text{g/ml}$ で反応させ、同様に検出した。ここで、KM2070は、ハイブリドーマKM2070（FERM BP-6196；W098/29544）により、産生される抗体である。尚、KM2070が認識する抗原分子の発現がPA6細胞ではないことをあらかじめ確認の上、KM2070をコントロール抗体として用いた。

第 9 図、第 10 図、第 11 図にそれぞれ示したように、PA6 細胞を免疫して得られた KM1306、KM1307、KM1310 は PA6 細胞を認識した。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。図中の nega は、抗体を添加しなかった時の結果を示す。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を選択的且つ効率的に分化誘導する方法、該分化誘導した細胞並びにそれらの用途が提供される。

#### 配列フリーテキスト

配列番号 1-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 2-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 3-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 4-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 5-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 6-人工配列の説明：合成 DNA

## 請 求 の 範 囲

1. 胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程を含む、胚性幹細胞を外胚葉細胞に分化誘導する方法。
2. 外胚葉細胞が、神経系細胞または表皮系細胞に分化しうる能力を有している細胞である、請求の範囲 1 に記載の方法。
3. 胚性幹細胞を非凝集状態で培養する工程を含む、胚性幹細胞を外胚葉由来の細胞に分化誘導する方法。
4. 外胚葉由来の細胞が、神経系細胞または表皮系細胞である、請求の範囲 3 に記載の方法。
5. 表皮系細胞が表皮細胞である、請求の範囲 4 に記載の方法。
6. 神経系細胞が以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 4 に記載の方法。
  - (a) 神経幹細胞；
  - (b) 神経細胞；
  - (c) 神経管の細胞；
  - (d) 神経堤の細胞。
7. 神経幹細胞が、ネスチンを発現している神経幹細胞である、請求の範囲 6 に記載の方法。

8. 神経細胞が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる神経細胞である、請求の範囲 6 に記載の方法。

- (a) ドーパミン作動性神経細胞；
- (b) アセチルコリン作動性神経細胞；
- (c)  $\gamma$  アミノ酪酸作動性神経細胞；
- (d) セロトニン作動性神経細胞。

9. アセチルコリン作動性神経細胞が、islet 1 を発現している運動神経細胞である、請求の範囲 8 に記載の方法。

10. 神経管の細胞が、以下の (a)、(b)、(c) および (d) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 6 に記載の方法。

(a) 神経管の腹側化因子であるソニックヘッジホック (Sonic hedgehog) に反応し腹側に位置する細胞に分化し、かつ神経管の背側因子である骨形成因子 4 (Bone Morphogenetic Protein 4) に反応し背側に位置する細胞に分化する能力を有する、背腹軸が決定される前の段階の神経管の細胞；

(b) 神経管の最も腹側の底板に位置する HNF-3  $\beta$  (Hepatocyte Nuclear Factor-3  $\beta$ ) を発現している神経管腹側の細胞；

(c) 神経管の腹側から HNF-3  $\beta$  (Hepatocyte Nuclear Factor-3  $\beta$ ) について 2 番目に存在するマーカー Nkx2.2 を発現している神経管腹側の細胞；

(d) Pax-7 を発現している神経管背側の細胞。

11. 神経堤の細胞が、AP-2 (Activator Protein 2) を発現している細胞である、請求の範囲 6 に記載の方法。



12. 骨形成因子 4 (Bone Morphogenetic Protein 4) 存在下で培養することを特徴とする、請求の範囲 1~11 のいずれか 1 項に記載の方法。

13. ソニックヘッジホック (Sonic hedgehog) 存在下で培養することを特徴とする、請求の範囲 1~12 のいずれか 1 項に記載の方法。

14. 非凝集状態が、エンブリオイドボディを介さない状態である、請求の範囲 1~13 のいずれか 1 項に記載の方法。

15. 無血清培養の条件下で培養する工程を含むことを特徴とする、請求の範囲 1~14 のいずれか 1 項に記載の方法。

16. ストローマ細胞由来の因子の存在下で培養することを特徴とする、請求の範囲 1~15 のいずれか 1 項に記載の方法。

17. ストローマ細胞存在下で培養することを特徴とする、請求の範囲 1~16 のいずれか 1 項に記載の方法。

18. ストローマ細胞が、物理化学的処理により増殖能力を失ったストローマ細胞である、請求の範囲 17 に記載の方法。

19. 物理化学的処理が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる処理である、請求の範囲 18 に記載の方法。

- (a) 抗癌剤による処理；
- (b) 放射線の照射による処理；
- (c) 病理診断で用いられる組織固定のための処理。

20. 抗癌剤が、マイトマイシンC、5-フルオロウラシル、アドリアマイシンおよびメトトレキセートからなる群から選ばれる抗癌剤である、請求の範囲 19 に記載の方法。

21. 病理診断で用いられる組織固定のための処理が、マイクロウエーブ固定、急速凍結置換固定、グルタルアルデヒド固定、パラフォルムアルデヒド固定、ホルマリン固定、アセトン固定、ブアン固定、過ヨウ素酸固定、メタノール固定およびオスミウム酸固定からなる群から選ばれる処理である、請求の範囲 19 に記載の方法。

22. ストローマ細胞が、ハイブリドーマFERM BP-7573 が産生するモノクローナル抗体で認識されるストローマ細胞である請求の範囲 16～21 のいずれか 1 項に記載の方法。

23. ストローマ細胞が、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) および (g) からなる群から選ばれるストローマ細胞である、請求の範囲 16～22 のいずれか 1 項に記載の方法。

- (a) 胎児初代培養繊維芽細胞；
- (b) SIHMマウス由来STO細胞；
- (c) マウス胎児由来NIH/3T3 細胞；
- (d) M-CSF欠損マウス頭蓋冠由来OP9 細胞；
- (e) マウス頭蓋冠由来MC3T3-G2/PA6 細胞；
- (f) 胚性幹細胞由来のストローマ細胞；
- (g) 骨髓間葉系幹細胞由来のストローマ細胞。

24. 胚性幹細胞が、以下の (a)、(b) および (c) からなる群から選ばれる細胞である、請求の範囲 1～23 のいずれか 1 項に記載の方法。

(a) 着床以前の初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞；

(b) 体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を培養することによって樹立した胚性幹細胞；

(c) (a) または (b) の胚性幹細胞の染色体上の遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて改変した胚性幹細胞。

25. 培養工程にレチノイン酸を添加しないことを特徴とする、請求の範囲 1～24 のいずれか 1 項に記載の方法。

26. 胚性幹細胞を外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞に分化誘導する効率が 5%以上である、請求の範囲 1～25 のいずれか 1 項に記載の方法。

27. 実質的に中胚葉系細胞の分化誘導を伴わない、請求の範囲 1～26 のいずれか 1 項に記載の方法。

28. 請求の範囲 1～27 のいずれか 1 項に記載の方法で用いる、胚性幹細胞を外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導するための培地。

29. 胚性幹細胞を外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する、ストローマ細胞由来の因子。

30. ムコ多糖吸着能を有する、請求の範囲 29 に記載の因子。

31. ムコ多糖がヘパリンである、請求の範囲 30 に記載の因子。

32. 骨形成因子 4 (Bone Morphogenetic Protein 4) を有効成分として含有する、外胚葉細胞から表皮系細胞への分化誘導剤。

33. 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞または該細胞由来の因子を有効成分として含む、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞への分化誘導剤。

34. ストローマ細胞が、請求の範囲 18～23 のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、請求の範囲 33 に記載の分化誘導剤。

35. ストローマ細胞由来の因子がムコ多糖吸着能を有する、請求の範囲 33 または 34 に記載の分化誘導剤。

36. ムコ多糖がヘパリンである、請求の範囲 35 に記載の分化誘導剤。

37. 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞を、ムコ多糖を含む培地中で培養して得られる培養上清を含む培地。

38. ストローマ細胞が、請求の範囲 18～23 のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、請求の範囲 37 に記載の培養上清を含む培地。

39. ムコ多糖がヘパリンである、請求の範囲 37 または 38 に記載の培養上清を含む培地。

40. 請求の範囲 37～39 のいずれか 1 項に記載の培養上清を有効成分として含む、外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞の分化誘導剤。

41. ストローマ細胞を免疫原として用いることを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞に分化誘導する活性を有するストローマ細胞を特異的に認識する抗体を取得する方法。

42. ストローマ細胞が、請求の範囲 18～23 のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、請求の範囲 41 に記載の方法。

43. 請求の範囲 41 または 42 に記載の方法により取得される、胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞を特異的に認識する抗体。

44. ハイブリドーマFERM BP-7573 が産生するモノクローナル抗体。

45. 請求の範囲 43 または 44 に記載の抗体を用いることを特徴とする、該抗体が認識する抗原を取得する方法。

46. 請求の範囲 45 に記載の方法により取得される、請求の範囲 43 または 44 に記載の抗体が認識する抗原。

47. 請求の範囲 46 に記載の抗原を含む細胞培養のための培地。

48. 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を指標に、胚性幹細胞から外胚葉由来の細胞へ分化誘導する活性を有するストローマ細胞由来の因子を取得する方法。

49. ムコ多糖とストローマ細胞由来の因子とを結合させる工程と、ムコ多糖に結合した該ストローマ細胞由来の因子から該因子を回収する工程を含む、請求の範囲 48 に記載の方法。

50. ストローマ細胞が、請求の範囲 18～23 のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、請求の範囲 48 または 49 に記載の方法。

51. ムコ多糖が、ヘパリンである、請求の範囲 49 に記載の方法。

52. 請求の範囲 1～27 のいずれか 1 項に記載の方法を用いることによって誘導される、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞。

53. 請求の範囲 52 に記載の外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞を、抗癌剤を含む培地中で培養する工程を含むことを特徴とする、胚性幹細胞から分化誘導された細胞の純度を高める方法。

54. 抗癌剤が、マイトマイシンC、5-フルオロウラシル、アドリアマイシン、メトトレキセートおよびアラCからなる群から選ばれる抗癌剤である、請求の範囲 53 に記載の方法。

55. 請求の範囲 53 または 54 に記載の方法を用いて得られる細胞。

56. 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求の範囲 1~27 のいずれか 1 項に記載の方法を行い、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程を比較することを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程における調節に関連する物質の評価方法。

57. 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求の範囲 1~27 のいずれか 1 項に記載の方法を行い、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程を比較することを特徴とする、胚性幹細胞から外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞までの分化過程における調節に関連する物質のスクリーニング方法。

58. 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求の範囲 52 に記載の細胞を培養し、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能を比較することを特徴とする、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能の調節に関連する物質の評価方法。

59. 被験物質存在下および該被験物質非存在下で、請求の範囲 52 に記載の細胞を培養し、該被験物質存在下と該被験物質非存在下での外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能を比較することを特徴とする、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞の機能の調節に関連する物質のスクリーニング方法。

60. 胚性幹細胞から外胚葉細胞および外胚葉由来の細胞を分化誘導する活性を有するストローマ細胞または該細胞由来の因子を含む医薬。

61. ストローマ細胞が、請求の範囲 18～23 のいずれか 1 項に記載のストローマ細胞である、請求の範囲 60 に記載の医薬。
62. 因子がムコ多糖吸着能を有する、請求の範囲 60 に記載の医薬。
63. ムコ多糖がヘパリンである、請求の範囲 62 に記載の医薬。
64. 請求の範囲 43 または 44 に記載の抗体を含む医薬。
65. 請求の範囲 46 に記載の抗原を含む医薬。
66. 請求の範囲 52 または 55 に記載の細胞を含む医薬。
67. 外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患の診断、予防および／または治療のための医薬である、請求の範囲 60～66 のいずれか 1 項に記載の医薬。
68. 外胚葉由来の細胞の障害に基づく疾患が、神経系細胞または表皮系細胞の障害に基づく疾患である、請求の範囲 67 に記載の医薬。
69. 神経系細胞の障害に基づく疾患が、アルツハイマー病、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、虚血性脳疾患、てんかん、脳外傷、背堆損傷、運動神経疾患、神経変性疾患、網膜色素変性症、内耳性難聴、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、または神経毒物の障害に起因する疾患であり、表皮系細胞の障害に基づく疾患が火傷、外傷、創傷治癒、床擦れ、または乾せんである、請求の範囲 68 に記載の医薬。



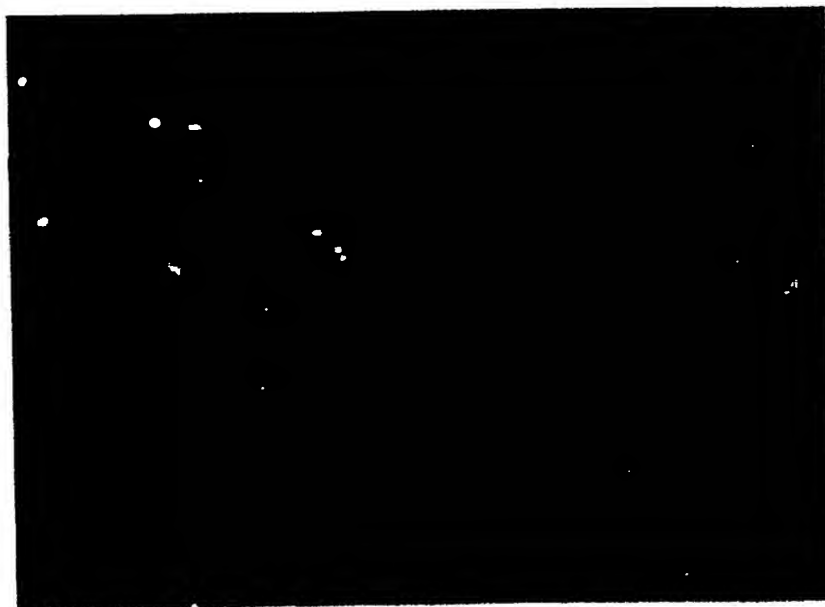
70. 請求の範囲 43 または 44 に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求の範囲 46 に記載の抗原の免疫学的検出法。

71. 請求の範囲 43 または 44 に記載の抗体を用いることを特徴とする、請求の範囲 46 に記載の抗原の免疫組織染色法。

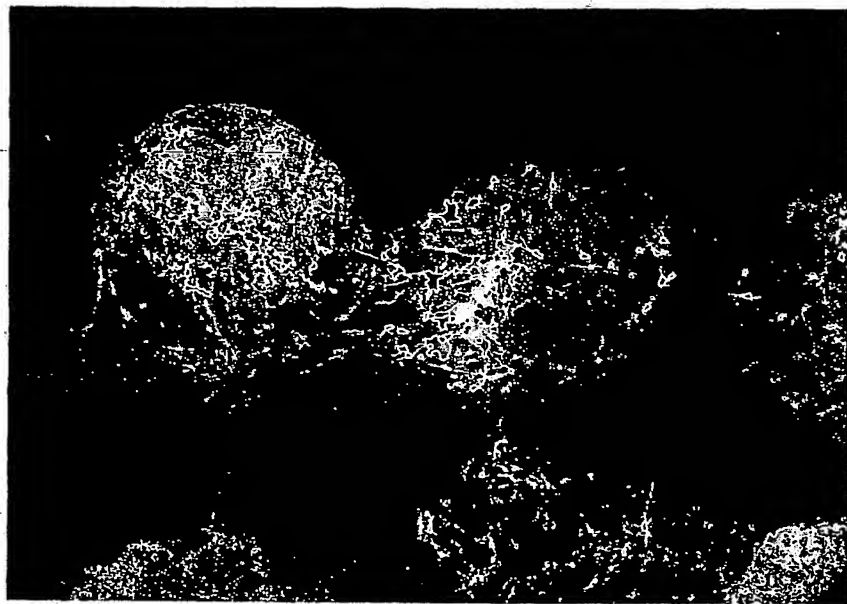
## 第 1 図



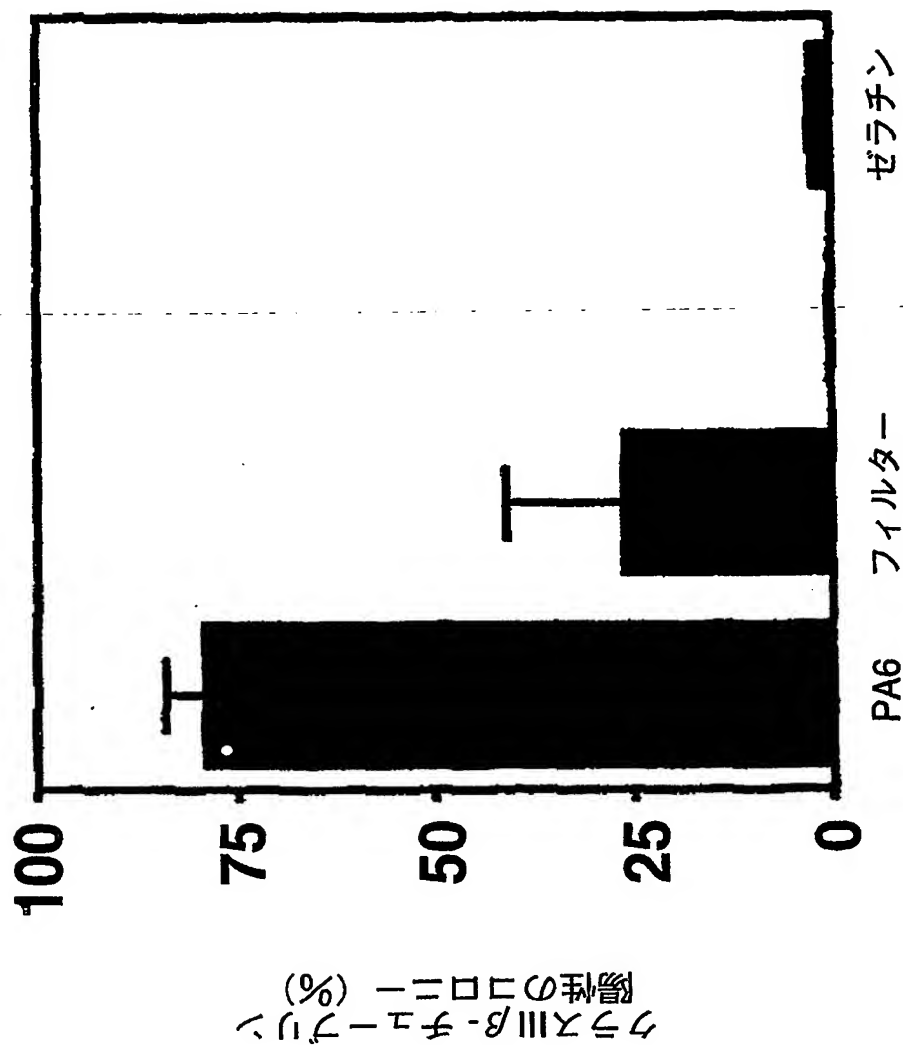
## 第 2 図



### 第 3 図

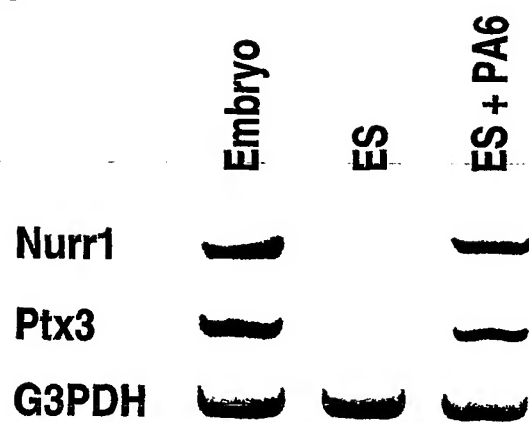


第6図

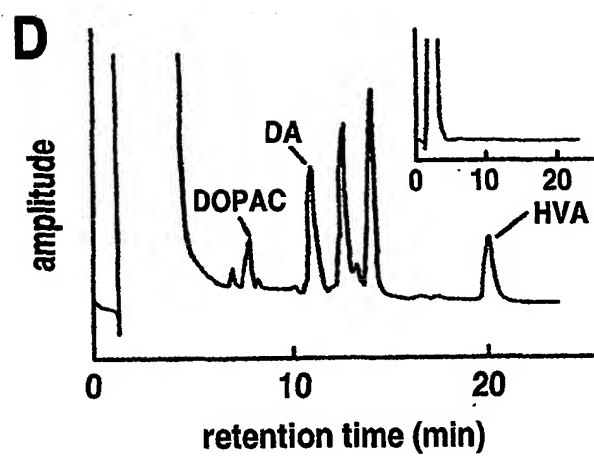


## 第 7 図

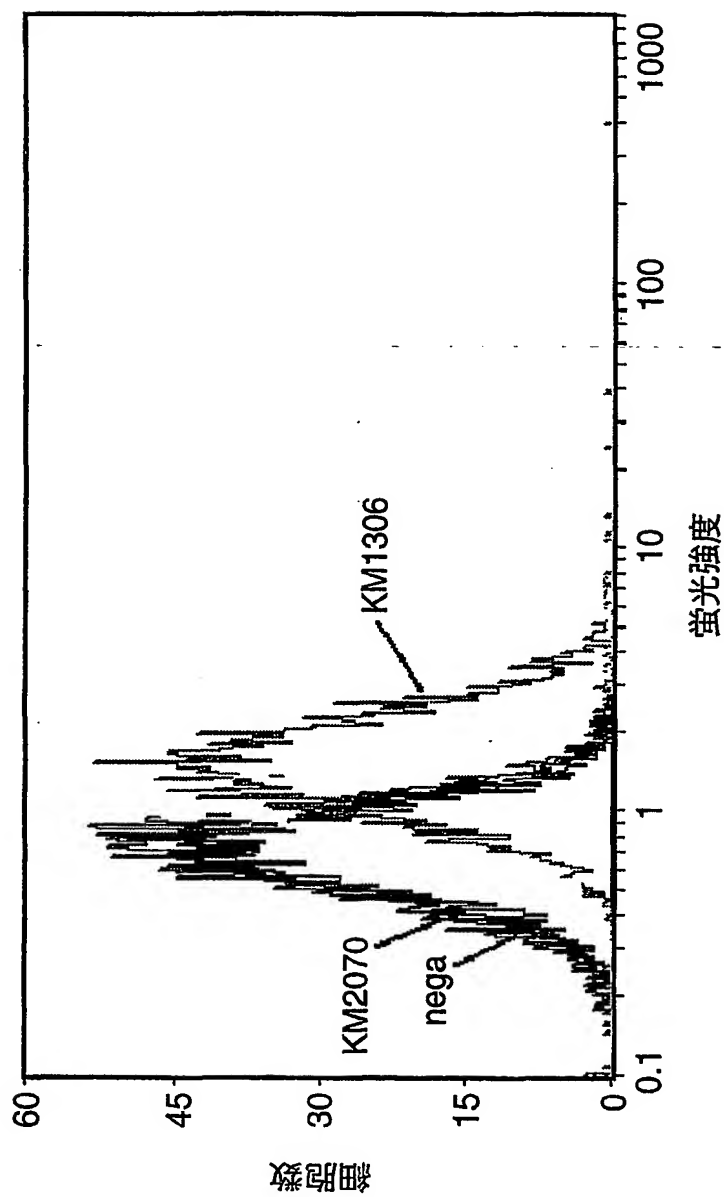
C



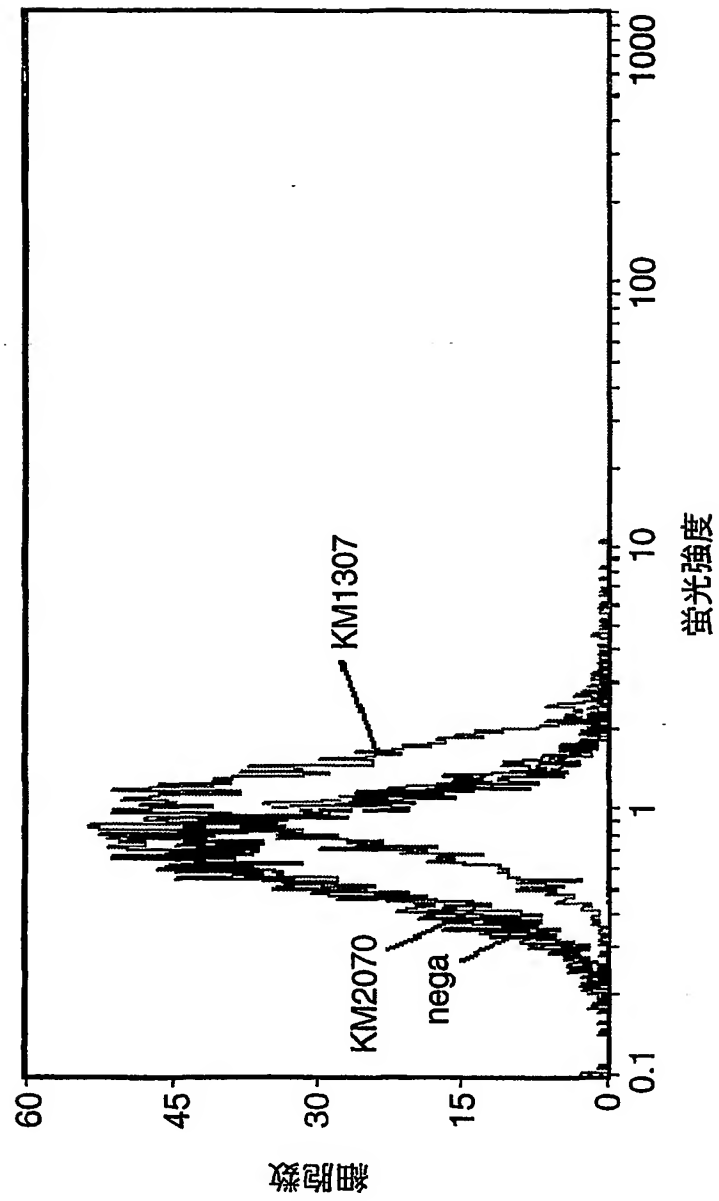
## 第 8 図



第9図

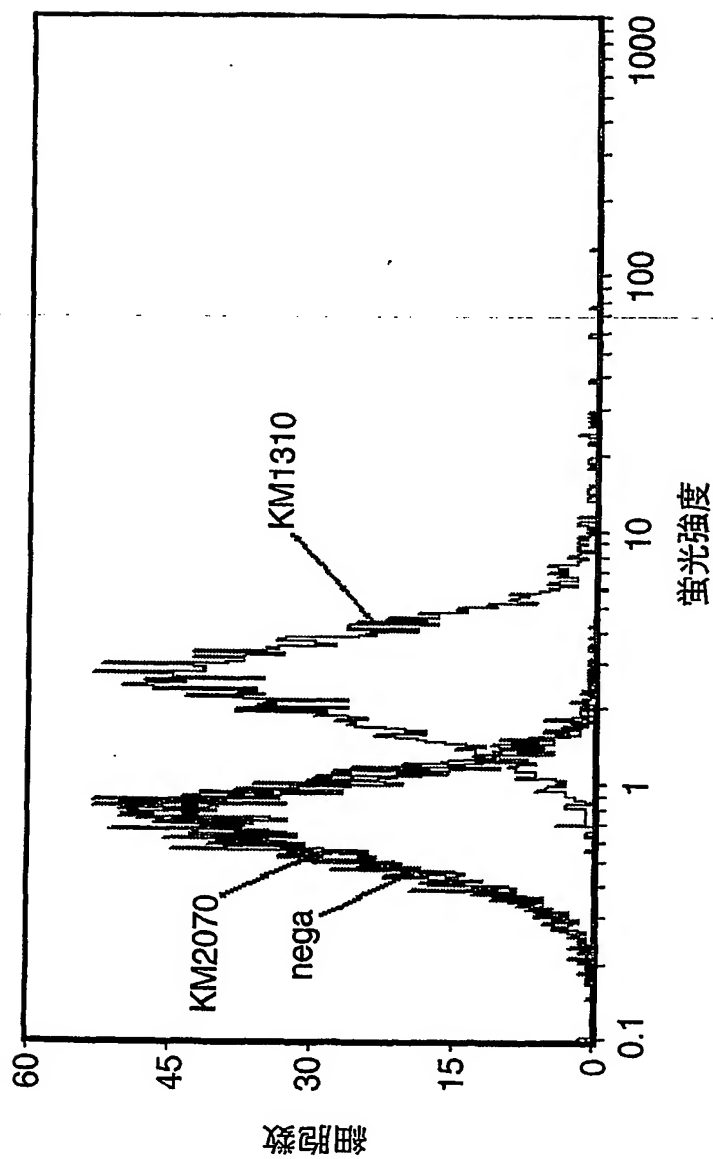


第10図





第11図



## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> NOVEL DIFFERENTIATION INDUCING PROCESS OF EMBRYONIC STEM CELL  
TO ECTODERMAL CELL AND ITS USE

<130> P-37313

<150> JP 2000-144059

<151> 2000-05-16

<150> JP 2000-290819

<151> 2000-09-25

<160> 6

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 1

tgaagagagc ggacaaggag atc

23

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 2

tctggagtta agaaatcgga gctg

24

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3  
aggacggctc tctgaagaa 19

<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4  
ttgaccgagt tgaaggcgaa 20

<210> 5  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5  
gaccacagtc catgcatca ct 22

<210> 6  
<211> 13  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 6  
tccaccaccc tgttgctgta g 21

出願人又は代理人の書類記号	P-37313	国際出願番号	PCT/JP01/04080
---------------	---------	--------	----------------

**寄託された微生物に関する表示**  
(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

102 頁、 9-12 行

B. 寄託の表示

他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

寄託機関のあて名(郵便番号及び国名を含む)

日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号 中央第6(郵便番号305-8566)

寄託の日付

平成13年(2001) 4月27日

受託番号

FERM BP-7573

C. 追加の表示(該当しない場合には記載しない)

この情報は別紙に続いている ☐

ヨーロッパ特許条約施行規則28(3)の規定に基づき、  
微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、  
試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する

D. この表示を行うための指定国(すべての指定国のために行わない場合)

EP

E. 追加事項の表示の届出(該当しない場合には記載しない)

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。(例えば「受託番号」のように表示事項を明記する)

受理官庁記入欄

☒ この用紙は国際出願とともに受理した

16.05.01

権限のある職員

山田 隆夫

国際事務局記入欄

☒ この用紙が国際事務局に受理された日

01 JUN 2001

権限のある職員

森 進

出願人又は代理人の書類記号

P-37313

国際出願番号

PCT/JP01/04080

**寄託された微生物に関する表示**  
〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

102

頁、

9-12

行

B. 寄託の表示

他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号 中央第6(郵便番号305-8566)

寄託の日付

平成13年(2001) 4月27日

受託番号

FERM BP-7573

C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない）

この情報は別紙に続いている ☐

オーストラリア特許法施行規則3.25の規定に基づき、  
本願に関し、ブタペスト条約に従って寄託された物質の試料は、  
本願の特許付与の前、又は本願の失効、取下げ若しくは拒絶の前にのみ、  
本発明に利害関係の無い熟練した名宛人であり、試料の提供をオーストラリア特許庁長官に  
要求した者によって任命された者に対してのみ行われるものとする。

D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

AU

E. 追加事項の表示の届出（該当しない場合には記載しない）

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）

受理官庁記入欄



この用紙は国際出願とともに受理した

16.05.01

権限のある職員

山田 正石

国際事務局記入欄



この用紙が国際事務局に受理された日

01 JUN 2001

権限のある職員

窪 進

出願人又は代理人の書類記号	P-37313	国際出願番号	PCT/JP01/04080
---------------	---------	--------	----------------

**寄託された微生物に関する表示**  
(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

102 頁、 9-12 行

B. 寄託の表示

他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

寄託機関のあて名(郵便番号及び国名を含む)

日本国茨城県つくば市東1丁目1番1号 中央第6(郵便番号305-8566)

寄託の日付

平成13年(2001) 4月27日

受託番号

FERM BP-7573

C. 追加の表示(該当しない場合には記載しない)

この情報は別紙に続いている ☐

カナダ特許法サブセクション104(4)及び  
同特許法規則160(4)の規定に基づき、  
微生物が、請求人により推薦された専門家にのみ、  
試料分譲されることを可能とすることを、出願人は希望する

D. この表示を行うための指定国(すべての指定国のために行わない場合)

CA

E. 追加事項の表示の届出(該当しない場合には記載しない)

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。(例えば「受託番号」のように表示事項を明記する)

受理官庁記入欄

☒ この用紙は国際出願とともに受理した

16.05.01

権限のある職員

山田 培雄

国際事務局記入欄

☒ この用紙が国際事務局に受理された日

01 JUN 2001

権限のある職員

窪 海

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04080

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N5/06, C07K16/18, C12P21/08, C12Q1/02, G01N33/50, G01N33/15,  
A61K35/48, 35/30, 35/36,  
A61P25/28, 25/00, 17/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N5/06, C07K16/18, C12P21/08, C12Q1/02, G01N33/50, G01N33/15,  
A61K35/48, 35/30, 35/36,  
A61P25/28, 25/00, 17/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WILSON, P.A. et al., Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4, Nature, 1995, Vol.376, No.6538, pp.331-333	32
X	KODAMA, H. et al., MC3T3-G2/PA6 preadipocytes support in vitro proliferation of hemopoietic stem cells through a mechanism different from that of interleukin 3, J Cell Physiol, 1986, Vol.129, No.1, pp.20-26	41-45, 70-71
P, X	KAWASAKI, H. et al., Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity, Neuron, October 2000, Vol.28, No.1, pp.31-40	1-28, 32, 37-45, 48-59, 61, 64-69
A	NAKANO, T. et al., In vitro development of hematopoietic system from mouse embryonic stem cells: a new approach for embryonic hematopoiesis, Int J Hematol, 1996, Vol.65, No.1, pp.1-8	1-28, 37-40, 48-59, 61, 64-69
A	VAN INZEN, W.G. et al., Neuronal differentiation of embryonic stem cells, Biochim Biophys Acta, 1996, Vol.1312,	1-28, 37-40, 48-59, 61, 64-69

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 19 July, 2001 (19.07.01)	Date of mailing of the international search report 31 July, 2001 (31.07.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04080

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	No.1, p.21-26 Kiyoshi KOMATSU et al., "Bunsan Baiyou wo mochiita Embryonic stem (ES) cell no in vitro Shinkei Bunka to Gap Ketsugou Saiboukan Communication no Kenkyuu", Sapporo Ishi, 1998, Vol. 67, No. 1-2, pp.11-22	53-55



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/04080

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 29-31,33-36,46-47,60,62-63  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
Concerning the "factor" and the "antigen" as described in the above claims, the description discloses no particular "factor" or "antigen" but merely a general screening method. Even though considering the common technical knowledge at the point of the application, it is completely unknown what particular substances are involved in the scopes thereof. Namely, these claims are described in a very unclear manner. Therefore, no meaningful international search can be made on the claims as described above.
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Concerning the "factor" and the "antigen" as described in the above claims, the description discloses no particular "factor" or "antigen" but merely a general screening method. Even though considering the common technical knowledge at the point of the application, it is completely unknown what particular substances are involved in the scopes thereof. Namely, these claims are described in a very unclear manner. Therefore, no meaningful international search can be made on the claims as described above.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP01/04080

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N5/06, C07K16/18, C12P21/08, C12Q1/02, G01N33/50, G01N33/15, A61K35/48, 35/30, 35/36, A61P25/28, 25/00, 17/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N5/06, C07K16/18, C12P21/08, C12Q1/02, G01N33/50, G01N33/15, A61K35/48, 35/30, 35/36, A61P25/28, 25/00, 17/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WILSON, P. A. et al., Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4, Nature, 1995, Vol. 376, No. 6538, p. 331-333	32
X	KODAMA, H. et al., MC3T3-G2/PA6 preadipocytes support in vitro proliferation of hemopoietic stem cells through a mechanism different from that of interleukin 3, J Cell Physiol, 1986, Vol. 129, No. 1, p. 20-26	41-45, 70-71

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.07.01

国際調査報告の発送日

31.07.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子



4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	KAWASAKI, H. et al., Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity, Neuron, October 2000, Vol. 28, No. 1, p. 31-40	1-28, 32, 37-45, 48-59, 61, 64-69
A	NAKANO, T. et al., In vitro development of hematopoietic system from mouse embryonic stem cells: a new approach for embryonic hematopoiesis, Int J Hematol, 1996, Vol. 65, No. 1, p. 1-8	1-28, 37-40, 48-59, 61, 64-69
A	VAN INZEN, W. G. et al., Neuronal differentiation of embryonic stem cells, Biochim Biophys Acta, 1996, Vol. 1312, No. 1, p. 21-26	1-28, 37-40, 48-59, 61, 64-69
A	小松磨史他, 分散培養を用いたEmbryonic stem (ES) cell の in vitro 神経分化とギャップ結合細胞間コミュニケーションの研究, 札幌医誌, 1998, 第67巻, 第1・2号, p. 11-22	53-55

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 29-31, 33-36, 46-47, 60, 62-63 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
前記請求の範囲の「因子」、「抗原」について、明細書には、一般的なスクリーニング方法が記載されているのみであり、具体的な「因子」、「抗原」については何ら記載されていない。また、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのようなものが包含されるのか全く不明であるから、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。したがって、前記請求の範囲について、有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(1) 共通する技術的特徴が「胚性肝細胞を非凝集状態で培養し、外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞に分化誘導する方法」である請求の範囲1-15、及び、請求の範囲24-28、52、56-59のうちの請求の範囲1-15に関連する部分、(2) 共通する技術的特徴が「胚性肝細胞を外胚葉細胞または外胚葉由来の細胞に分化誘導するストローマ細胞またはストローマ細胞由来の因子」である請求の範囲16-23、29-31、33-51、60-71、及び、請求の範囲24-28、52、56-59のうちの請求の範囲16-23に関連する部分、(3) 共通する技術的特徴が「骨形成因子4を含有する外胚葉細胞から表皮系細胞への分化誘導剤」である請求の範囲32、(4) 共通する技術的特徴が「細胞の純度を高める方法」である請求の範囲53-55は、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとはいえないから、本出願の請求の範囲に記載された発明の数は4と認める。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**